



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA
DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Acumulación de elementos potencialmente tóxicos (Cd, Cr y Pb)
en abejas (*Apis mellifera*) y sus productos, en el estado de
Hidalgo, México**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

BIOL. JANICE VIRIDIANA MONTIEL PIMENTEL

DIRECTORA:

DRA. YOLANDA MARMOLEJO SANTILLÁN

CO DIRECTOR:

DR. IGNACIO ESTEBAN CASTELLANOS STUREMARK

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO, JULIO DE 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
School of Engineering and Basic Sciences
Área Académica de Química
Department of Chemistry

Mineral de la Reforma, Hgo., a 30 de julio de 2020.

Número de control: ICBI-D/515/2020
Asunto: Autorización de impresión de tesis.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado a la C. **Janice Viridiana Montiel Pimentel**, alumno del Doctorado en Ciencias Ambientales con número de cuenta 111577, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado "**Acumulación de elementos potencialmente tóxicos (Cd, Cr y Pb) en abejas (*Apis mellifera*) y sus productos, en el estado de Hidalgo, México**", en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE	Dr. Francisco Prieto García
SECRETARIO	Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún
VOCAL	Dr. Ignacio Esteban Castellanos Sturemark

Sin otro particular reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
Director del ICBI



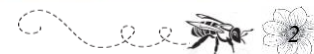
OAAS/YMS



Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México C.P. 42184
Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2200, 2201
Fax 6502
aaq_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Janice Viridiana Monnei Pimentel



AGRADECIMIENTOS.

A la **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo**, representada por el rector, Maestro Adolfo Pontigo Loyola.

A los apreciables miembros de mi comité tutorial:

Dra. Yolanda Marmolejo Santillán

Por apoyarme en todo momento y creer en mí; por mostrarme que la calidad humana es un componente primordial para alcanzar mis metas.

Dr. Ignacio Castellanos Sturemark

Por los conocimientos que ha compartido conmigo desde hace quince años; gracias por sus enseñanzas, consejos, risas y reflexiones, pero, sobre todo, por su amistad.

Dr. Francisco Prieto García

Por su paciencia, apoyo y todas las sugerencias durante el doctorado.

Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún

Por mostrarme el camino hacia la biología, hace veinte años, sin ese mensaje, no estaría aquí; muchas gracias por compartir sus conocimientos con tanta pasión.

Dr. Fidel Pérez Moreno

No tengo palabras para agradecer todo el apoyo que me brindó, fue imprescindible para la realización de este proyecto.

Por el apoyo económico otorgado por el CONACYT como estudiante del Doctorado en Ciencias Ambientales, perteneciente al Programa Nacional de Posgrado de Calidad con registro del PNPC CONACYT 00312.



DEDICATORIA.

Quisiera agradecer y dedicar este proyecto a tantas personas que han contribuido a mi aprendizaje y han estado conmigo en los momentos más importantes de mi vida y durante este viaje que empezó hace seis años.

A Dios y a la vida que me permiten concluir este proyecto.

A mi esposo Javier, por aceptar caminar a mi lado y rescatarnos uno al otro, por representar tantas cosas para mí y compartir un proyecto de vida; a mis hijos Valeria y Javierecito: ustedes son la razón por la que cada día me levanto y doy lo mejor de mí; gracias por ser la luz que ilumina mi vida, los amo.

A mis papás, porque gracias a ustedes soy lo que ahora soy y sé que siempre estarán a mi lado, apoyándome y motivándome.

A mis hermanos y hermosos sobrinos, por creer en mí y siempre animarme e impulsarme a seguir adelante, agradezco infinitamente a la vida que sean ustedes quienes me sostienen cuando estoy por rendirme.

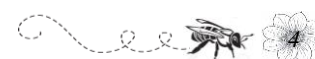
A Maryev por estar conmigo en todo momento y en cada aventura, por escucharme y por cada consejo; a Anita, por tu increíble amistad; a mis compañeros que tuve la oportunidad de conocer durante el doctorado.

A mis seres queridos que de alguna forma han estado conmigo, a mi abue, a mi suegra, a mis tíos y primos.

A la Dra. Yola, Dr. Nacho, Dr. Gaytán, Dr. Prieto, Dr. Fidel, Dr. Otilio, Dra. Iriana y Dr. Pablo, por sus consejos y enseñanzas que hicieron posible concluir mi trabajo.

Al Lic. Hegel Martínez y Lic. Juan Dimas, por su apoyo en todo momento.

A cada persona que contribuyó a mi formación y aprendizaje.

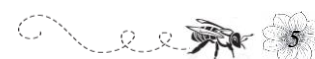


ÍNDICE

Introducción	1
Antecedentes	3
<i>Apis mellifera</i>	3
Contaminantes ambientales	3
Metales pesados como elementos potencialmente tóxicos	5
Cadmio	6
Cromo	7
Plomo	7
Bioacumulación	8
<i>Apis mellifera</i> y sus productos como bioindicadores	9
Justificación	11

CAPÍTULO I: NIVELES DE CADMIO, CROMO Y PLOMO EN ABEJAS (*Apis mellifera*) Y SUS PRODUCTOS EN HIDALGO, MÉXICO

Introducción	12
Material y métodos	13
Área de estudio	13
Zona agrícola	13
Zona urbana	13
Zona rural con vegetación nativa	13
Colecta de muestras	15
Procesamiento de las muestras	16
Análisis estadísticos	16
Resultados	17
Discusión	19
Abeja	19
Miel	20



Propóleo	21
Cera	22
Conclusión	23

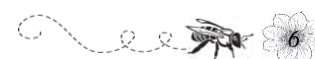
CAPITULO II: PRESENCIA DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS

(CADMIO, CROMO Y PLOMO) EN ABEJAS A LO LARGO DE UN GRADIENTE DE URBANIZACIÓN

Introducción	24
Objetivos	25
Metodología	25
Descripción del área de estudio	25
Trabajo en campo	26
Colecta de muestras	26
Trabajo en laboratorio	26
Procesamiento de las muestras	27
Digestión de muestras	27
Análisis estadísticos	27
Resultados y discusión	28
Conclusión	35

CAPÍTULO III: DOSIS LETAL Y FACTOR DE BIOACUMULACIÓN DE Cd, Cr Y Pb EN ADULTOS DE ABEJAS (*Apis mellifera*)

Introducción	36
Objetivos	37
Metodología	37
Colecta de muestras	37
Optimización de condiciones en laboratorio para mantenimiento de abejas adultas (<i>Apis mellifera</i>)	
Temperatura y humedad relativa	38
Diseño experimental	39
Tratamiento oral agudo	39



Procesamiento de las muestras	40
DL ₅₀	40
Factor de Bioacumulación	40
Digestión de muestras	41
Análisis estadísticos	41
Resultados y discusión	42
Cadmio	42
Cromo	45
Plomo	48
Conclusión	49
Referencias bibliográficas	50



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Mapa del estado de Hidalgo que muestra los sitios seleccionados dentro del área de estudio (1. ITSH; 2. El Cerro; 3. San Felipe; 4. El Huixmi; 5. Atitalaquia; 6. Almoloya; 7. Mixquiahuala; 8. Progreso; 9. Tepeji; 10. Tezontepec).....	15
Figura 2: Mapa del estado de Hidalgo que muestra los sitios seleccionados dentro del área de estudio	26
Figura 3. Especies encontradas en el gradiente de urbanización en la zona metropolitana de Pachuca, <i>Apis mellifera</i> (exótica), <i>Diadasia</i> sp. y <i>Lithurgus littoralis</i> (nativas). (Fotografía: Montiel-Pimentel y Sánchez-Echeverría, 2016)	28
Figura 4. Concentraciones promedio de cadmio y cromo (\pm error estándar) en tres especies de abejas, <i>Apis mellifera</i> , <i>Diadasia</i> sp y <i>Lithurgus littoralis</i>	29
Figura 5. Concentraciones promedio de cadmio y cromo (\pm error estándar) encontradas en abejas de sitios con diferente grado de urbanización.	31
Figura 6. Concentración promedio de cromo (\pm error estándar) encontrada en <i>Apis mellifera</i> en sitios con diferente grado de urbanización. Diferentes letras denotan diferencias significativas entre sí ($P < 0.05$).	32
Figura 7. Concentración promedio de cromo (\pm error estándar) encontrada en <i>Lithurgus littoralis</i> en sitios con diferente grado de urbanización. Diferentes letras denotan diferencias significativas entre sí ($P < 0.05$).	32
Figura 8. Recipientes para el mantenimiento de abejas separadas individualmente.	39
Figura 9. Regresión lineal dosis respuesta de cadmio (CdCl_2) en abejas <i>Apis mellifera</i> . DL50: Dosis Letal 50	43
Figura 10. Respuesta dosis y tiempo de la acumulación de cadmio. $\text{C1} = 5 \mu\text{g g}^{-1} \text{CdCl}_2$, $\text{C2} = 10 \mu\text{g g}^{-1} \text{CdCl}_2$, $\text{C3} = 15 \mu\text{g g}^{-1} \text{CdCl}_2$. Concentraciones promedio \pm error estándar.	44
Figura 11. Regresión lineal dosis respuesta de cromo en abejas <i>Apis mellifera</i> . DL50: Dosis Letal 50.	46

Figura 12. Respuesta dosis y tiempo de la acumulación de cromo.

C1=2 $\mu\text{g g}^{-1}$ CrCl₂, C2=4 $\mu\text{g g}^{-1}$ CrCl₂, C3=6 $\mu\text{g g}^{-1}$ CrCl₂.

Concentraciones promedio \pm error estándar. 47

Tabla 1. Sitios de muestreo de acuerdo al uso de suelo en el estado de Hidalgo..... 14

Tabla 2. Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$) de cadmio en abejas y sus productos en el estado de Hidalgo..... 17

Tabla 3. Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$) de cromo en abejas y sus productos en el estado de Hidalgo..... 18

Tabla 4. Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$) de plomo en abejas y sus productos en el estado de Hidalgo..... 18

Tabla 5. Tamaño e imagen de las tres especies analizadas (*Apis mellifera*, *Lithurgus littoralis* y *Diadasia* sp.) (Michener *et al.*, 2007). (Fotografías: NaturaLista, 2020; Mary Paul, 2007; BEEC, 2020) 30

Tabla 6. Límites de referencia de metales en abejas en sitios con diferentes niveles de contaminación (Gutiérrez, *et al.*, 2015)..... 34

Tabla 7: Condiciones de prueba para el desarrollo de bioensayo de toxicidad aguda en abejas (*Apis mellifera*)..... 38

Tabla 8. Tratamientos para determinar dosis letal en *Apis mellifera*..... 40

Tabla 9. Factor de bioacumulación de cadmio en abejas (*Apis mellifera*)..... 44

Tabla 10. Factor de bioacumulación de cromo en abejas (*Apis mellifera*)..... 47



ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	62
ANEXO 2: CONCENTRACIONES DE METALES EN LOS SITIOS CON DIFERENTE USO DE SUELO.....	64
ANEXO 3: REGULACIÓN.....	66
ANEXO 4: PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS	67

INTRODUCCIÓN

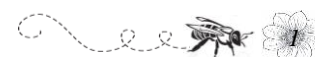
Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) es uno de los grupos de mayor importancia en servicios de polinización a nivel mundial, ya que un importante porcentaje de plantas dependen en algún grado de éstas abejas para una producción eficiente y es la especie de polinizador más utilizada comercialmente en el país.

En las últimas décadas los niveles de contaminación han ido en aumento por diferentes actividades humanas que han dado como resultado un fuerte impacto sobre los componentes del medio natural y la salud pública. La contaminación en agua, aire y suelo por acumulación de elementos potencialmente tóxicos, resultado de procesos como la urbanización, minería, agricultura e industria, ha ocasionado un importante daño en la salud ambiental y pérdida de biodiversidad.

Las funciones de los sistemas biológicos dependen de los recursos que les brinda el ambiente en el que se desarrollan, respondiendo significativamente a los cambios a los que son sometidos por la presencia de contaminantes. Algunos organismos pueden servir como indicadores que ayudan a la detección y monitoreo de los agentes causantes de contaminación, buscando entender los procesos para incluir medidas de remediación que mejoren la calidad de los factores ambientales.

La pérdida de poblaciones de abejas, ha sido estudiada en los últimos años y puede estar relacionada con la prevalencia de patógenos, pérdida y fragmentación de hábitats, disponibilidad de recursos, así como con la presencia de elementos potencialmente tóxicos. Existe un considerable número de trabajos que destacan el impacto de la acumulación de metales pesados en miel, propóleo, polen, néctar y jalea real que disminuyen su calidad (Lambert *et al.*, 2012; Sadeghi *et al.*, 2012; Hladun *et al.*, 2013; Meindl y Ashman, 2013; García *et al.*, 2016; Giglio *et al.*, 2017).

Los metales pueden llegar a las abejas a través de aire en partículas que pueden adherirse a su cuerpo durante el vuelo o pueden ser ingeridos a través del polen y néctar de las flores; cuando estos elementos se bioacumulan en las abejas pueden ocasionar efectos letales y subletales, principalmente en el desarrollo de larvas y adultos (Di *et al.*, 2016; Van der Steen *et al.*, 2016).



El presente trabajo se ha dividido en tres capítulos, en el primero se muestran los resultados de las concentraciones de cadmio, cromo y plomo en abejas y sus productos, colectados en tres zonas del estado de Hidalgo, clasificadas de acuerdo al uso del suelo como urbanas, agrícolas y rurales, ya que el tipo de contaminantes presentes en un sitio, depende de las actividades que se desarrollan dentro de él. El objetivo fue identificar y cuantificar el contenido de elementos potencialmente tóxicos en muestras de abeja, miel, propóleo y cera, en tres zonas con diferente uso de suelo, mediante técnicas espectroscópicas, para probar si existen concentraciones de riesgo de estos elementos en los organismos y sus productos.

En el segundo capítulo se estudió la presencia de cadmio, cromo y plomo en tres especies de abejas, *Apis mellifera*, *Diadasia* sp., y *Lithurgus littoralis*, a través de un gradiente de urbanización dentro de la zona metropolitana de Pachuca, Hidalgo, para determinar si existen concentraciones de riesgo de estos elementos en los organismos y conocer si existen diferencias en las concentraciones en los niveles de urbanización estudiados.

En el tercer capítulo se evaluó la toxicidad de metales pesados en adultos de abejas de la especie *Apis mellifera*, para lo cual se realizó un bioensayo mediante el desarrollo de una técnica propuesta con las condiciones controladas de alimento, temperatura, humedad, así como dosis y tiempo de exposición en un tratamiento oral agudo con concentraciones de cadmio, cromo y plomo, para conocer la Concentración Letal 50 (LC 50) y el Factor de Bioacumulación (FB) en las abejas.



ANTECEDENTES

Apis mellifera

Las abejas de la especie *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), son organismos de distribución mundial, con una estructura social altamente organizada en colonias, distribuidas en tres castas: reina (una hembra fértil por colmena), obreras (de 3 mil a 50 mil hembras estériles por colmena) y zánganos (cerca de 200 machos con funciones reproductivas) (Padilla *et al.*, 2003).

El desarrollo de una abeja comienza con la etapa de larva dentro de una celda de la colmena; cuando la larva se desarrolla, se convierte en prepupa, posteriormente en pupa, para finalmente emerger como adulto; este proceso puede tardar aproximadamente tres semanas. La vida de una abeja obrera puede durar hasta 60 días en verano y hasta 180 días en invierno, mientras que la abeja reina puede vivir hasta 6 años. La organización dentro de la colmena, contempla diversas funciones realizadas por las abejas obreras, tales como limpieza, cuidado y alimentación de las larvas, construcción, producción y almacenamiento de miel y jalea real y forrajeo o pecoreo (recolección de alimento) (Padilla *et al.*, 2003).

Apis mellifera se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial y es un grupo de gran importancia en procesos de polinización y en algunos países se considera que es el principal proveedor de servicios de polinización de cultivos; se conoce que cerca del 85% de las especies de plantas que producen frutas y/o semillas para consumo humano en México, dependen en algún grado de los polinizadores para una producción eficiente (Michener, 2007; Ashworth *et al.*, 2009). *A. mellifera* es la especie de polinizador más utilizada comercialmente en el país (Torres *et al.*, 2013; Frausto *et al.*, 2017), ya que se considera que en México se producen cerca de 57 mil toneladas anuales de miel, de las cuales exportan 42 mil toneladas, cifra que lo convierte en el tercer país exportador a nivel mundial (PROY-NOM-004-SAG/GAN-2017). Para el caso del estado de Hidalgo, en el año 2017, se registró una producción de 6,539.18 toneladas de miel, lo cual lo coloca en el lugar 13 a nivel nacional (SAGARPA HIDALGO, 2017).

CONTAMINANTES AMBIENTALES

Algunas actividades industriales generan productos químicos de gran demanda en la actualidad; el impacto sobre el ambiente por la producción, consumo y desecho de antibióticos, aceites, refrigerantes, lubricantes, entre muchos otros, es de importancia global (Bogdanov *et al.*, 2006). El uso de productos

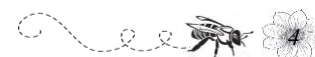


químicos resulta en la integración de contaminantes en aire, agua y suelo, afectando directamente la estructura y composición de algunos sistemas biológicos (Lambert *et al.*, 2012).

La agricultura es una de las actividades económicas más importantes, ya que asegura la alimentación de la población mundial y el desarrollo económico; sin embargo, la práctica de actividades agroindustriales tiene como resultado la generación de elevados índices de contaminación por el uso inmoderado de agroquímicos (fertilizantes y pesticidas, como insecticidas, fungicidas, herbicidas y bactericidas), que tienen como resultado la acumulación en suelo principalmente de metales pesados como cobre, cadmio y níquel (Bogdanov *et al.*, 2006; Gergoks *et al.*, 2009). Por otra parte, el mecanismo agrícola considera el uso de arado, irrigación, cosecha, quema de residuos y uso de aguas residuales que modifican los procesos del suelo y repercuten en la disponibilidad de nutrientes (Gergoks *et al.*, 2009).

La urbanización se encuentra asociada muy estrechamente a mecanismos de contaminación, fragmentación y pérdida de suelo que puede originar cambios en la densidad y riqueza de especies (Hobbelen *et al.*, 2006) o tener efectos sobre los recursos de los que las especies dependen (Santorufu *et al.*, 2012). Los ambientes urbanos han sido definidos como mosaicos de superficies impermeables y permeables que comúnmente contienen hábitats perturbados (Fortel *et al.*, 2014). En estos ambientes, las áreas verdes se ven reducidas y han sido reemplazadas por una cobertura de superficies impermeables que incluyen construcciones, caminos y zonas industriales (Moron *et al.*, 2012). Se han encontrado mayores concentraciones de metales pesados en zonas urbanas con respecto a rurales (Perugini *et al.*, 2011) y en las zonas urbanas estos elementos generalmente se encuentran en elevadas concentraciones en los sitios con mayor actividad industrial o elevado tráfico vehicular, pudiendo afectar negativamente a la flora y fauna presentes (Charlesworth *et al.*, 2010).

El desarrollo urbano genera un incremento en los niveles de contaminación ambiental que influye en gran medida en la integración de elementos tóxicos a los recursos utilizados y productos elaborados por organismos polinizadores (Kalbande *et al.*, 2008; Cozmuta *et al.*, 2012). La calidad del suelo en áreas naturales difiere significativamente a la observada en áreas transformadas, lo cual se ve reflejado en las comunidades de organismos del suelo, ya que, en un ambiente natural sin actividad minera, agrícola e industrial, se observa una mayor cantidad de materia orgánica y agua con bajas concentraciones de metales pesados que favorecen los procesos y servicios del suelo (Santorufu *et al.*, 2012). La transformación de los espacios naturales a ambientes urbanos, afecta directamente sobre la conducta, fisiología o



supervivencia de algunos grupos de organismo como aves, anfibios, reptiles, plantas e insectos (McDonnell *et al.*, 2015).

METALES PESADOS COMO ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS

Los metales pesados son un grupo de elementos de alta densidad de la tabla periódica que pueden encontrarse en aire, agua y suelo como resultado de procesos naturales como formación de rocas y suelo, vulcanismo y erosión y algunos, en bajas concentraciones, son considerados esenciales para el correcto funcionamiento de actividades fisiológicas en diversos organismos, entre los que podemos encontrar al cromo, hierro, cobre, aluminio y níquel, los cuales permiten la absorción de proteínas y lípidos, aceleran el metabolismo de carbohidratos, ayudan a la producción hormonal, transferencia de electrones, formación de huesos y tejidos (Davodpour *et al.*, 2019). Si aumenta la concentración de los elementos esenciales o traza, puede tener efectos tóxicos para el organismo (Díaz *et al.*, 2019).

Los elementos metálicos no esenciales como el cadmio, plomo, mercurio, arsénico y manganeso, muchas veces son el resultado de actividades que realiza el hombre, tales como urbanización, agricultura, minería y procesos industriales (Mogren y Trumble, 2010; Lichtfouse *et al.*, 2013; Covarrubias *et al.*, 2017) y pueden actuar como contaminantes, causando daños toxicológicos a los organismos con los que están en contacto (Nagajyoti *et al.*, 2010).

Los organismos responden de diferente manera a la presencia de metales pesados; la sensibilidad o resistencia a la contaminación depende de cada especie (Santorufó *et al.*, 2012). Se han realizado diversos trabajos que documentan la influencia de concentraciones elevadas de metales como cadmio, cromo, cobre, níquel, litio y plomo sobre la composición de la estructura de comunidades de polinizadores (Mogren y Trumble, 2010; Lambert *et al.*, 2012; Santorufó *et al.*, 2012), en la dinámica de poblaciones de algunos artrópodos (Hobbelen *et al.*, 2006; Gergoks *et al.*, 2009; Khalil *et al.*, 2009; Sadeghi *et al.*, 2012; Wahl *et al.*, 2012), en la densidad de ácaros y colémbolos (Santamaría *et al.*, 2012) y la diversidad y abundancia de abejas silvestres y abejorros (Moron *et al.*, 2012). La respuesta de organismos a la presencia de dichos elementos, depende de la especie a la que pertenecen, ya que algunos invertebrados presentan mayor sensibilidad a agentes contaminantes, mientras que otros, resultan ser más resistentes (Creamer *et al.*, 2008). De igual manera, los insectos generalistas pueden bioacumular mayores concentraciones, debido a su presencia en los insectos de los que se alimentan (Butt *et al.*, 2018).



Los metales pesados intervienen en los procesos de algunos grupos de organismos, principalmente *A. mellifera*, tales como la locomoción (Collet y Belzunces, 2007), comportamiento (Berry *et al.*, 2013), metabolismo (Gauthier *et al.*, 2016; Jumarie *et al.*, 2017) y supervivencia (Johnson, 2015; Zaric *et al.*, 2016), ya que los metales que se encuentran en el suelo se incorporan a las plantas a través de sus raíces y los metales presentes en el aire son incorporados a la planta a través de la absorción de la superficie foliar (Nagajyoti *et al.*, 2010; Cozmuta *et al.*, 2012); estos elementos viajan a través del cuerpo de la planta y se acumulan en estructuras específicas, como raíces (Sekhar *et al.*, 2004), flores (Migdalek *et al.*, 2013) e incluso polen (Perna *et al.*, 2012). Las plantas redistribuyen los metales pesados y se incorporan a nuevos sistemas biológicos que dependen de éstas, causando efectos metabólicos, reducción del crecimiento, alteraciones en la reproducción, baja producción de biomasa, acumulación y toxicidad que reducen la calidad de vida y pueden causar la muerte (Seregin y Kozhevnikova, 2006; Nagajyoti *et al.*, 2010; Tran y Popova, 2013).

A. mellifera ha desarrollado respuestas fisiológicas a estresores ambientales como metales pesados; Gizaw *et al.*, (2020), encontraron una mayor respuesta de detoxificación de metales en abejas urbanas con respecto a rurales (zona montañosa y agrícola).

CADMIO

El cadmio es un metal que se encuentra en el ambiente por causas naturales o antropogénicas y es uno de los metales más biopersistentes en el ambiente (Wahl *et al.*, 2012); se obtiene a partir de diversas actividades como la producción de pigmentos, cigarrillos, PVC, baterías, recubrimientos, pinturas, refinación del zinc, pesticidas, fertilizantes, fungicidas, pirotecnia, aguas residuales y minería (Kalbande *et al.*, 2008; Mogren y Trumble, 2010). Este elemento es considerado uno de los metales con mayor toxicidad (Kalbande *et al.*, 2008). Este metal se bioacumula en diferentes concentraciones de acuerdo a la especie de organismo en la que se encuentra (Van der Fels *et al.*, 2016; Butt *et al.*, 2018) y depende de su edad, fisiología, tamaño y genética (Butt *et al.*, 2018). En humanos, el cadmio puede causar daño en tejidos y órganos, además de tener efectos carcinógenos (WHO, 2019).

En el caso de algunas moscas, el cadmio se acumula mayormente en larvas que, en adultos, debido a que la excreción es menor en larvas (Diener *et al.*, 2015). La presencia de cadmio en el ambiente puede tener efectos negativos sobre algunos grupos de organismos; se ha observado que puede producir

inhibición en el crecimiento y producción de huevos, disminución en las reservas energéticas de carábidos (Maryanski *et al.*, 2002), así como afectar la estructura de comunidades y fecundidad y aumentar la mortalidad en la descendencia y cambios en la distribución y respuesta fisiológica de ácaros del suelo (Caruso *et al.*, 2009; Khalil *et al.*, 2009; Seniczak *et al.*, 2009), también se ha observado que el cadmio puede producir fitotoxicidad (Kalbande *et al.*, 2008; Nagajyoti *et al.*, 2010).

El cadmio se incorpora a las cadenas tróficas y se bioacumula en abejas, al utilizar el recurso que le proporciona la planta contaminada (Ping *et al.*, 2009; Matin *et al.*, 2016). El cadmio consumido por *Apis mellifera* disminuye su desarrollo, ya que la abeja disminuye el consumo del recurso contaminado después de una sensación de malestar (Di *et al.*, 2016). Eskova (2012) observó que el cadmio consumido por la abeja, puede ser eliminado hasta en un 75% en el día 18 y que el cadmio es acumulado mayormente en la sección abdominal.

CROMO

El cromo es un elemento de la tabla periódica que forma diferentes compuestos de acuerdo a su estado de oxidación, entre los que se pueden encontrar crómicos con valencia III o cromatos con valencia VI (hexavalente); éste último, es altamente tóxico y puede tener acción carcinogénica o mutagénica en algunos grupos de organismos (Paš *et al.*, 2004). En estado natural, es un elemento esencial que interviene en el metabolismo de carbohidratos y lípidos en humanos; puede encontrarse en la formación de suelo y rocas e interviene en procesos fisiológicos de plantas y animales. Industrialmente es utilizado en el cromado de diversas piezas, producción de acero inoxidable, aleaciones con otros metales, pigmentos, anticorrosivos, esmaltes, industria textil, catalizadores, madera tratada con dicromato de cobre y cuero curtido (ATSDR, 2012; Gunnar, 2012).

El cromo es un metal que se ha estudiado poco en abejas, pero con gran importancia toxicológica, ya que es un elemento que se utiliza en diversos procesos industriales y puede incorporarse a la abeja y sus productos (Davodpour *et al.*, 2019).

PLOMO

El plomo es un metal que se encuentra en diversos minerales en la naturaleza. La concentración de plomo en el ambiente, depende de las condiciones meteorológicas y los procesos del suelo. Es utilizado



en la industria química y automovilística, explosivos, cubiertas de rayos X, aditivos de gasolina, en la construcción, el revestimiento de cables, baterías eléctricas, acumuladores, pinturas, esmaltes, vidrio, pigmentos, cosméticos y juguetes (Gunnar, 2012). El plomo es un elemento potencialmente tóxico que puede producir efectos gastrointestinales, musculares, reproductivos, neurológicos, conductuales y genéticos en algunos grupos de organismos. En humanos puede acumularse y causar daños en cerebro, hígado, riñones y huesos (WHO, 2019).

Este elemento tiene importancia toxicológica y al igual que el cadmio, es uno de los más estudiados en abejas, sin embargo, en los estudios realizados, se han encontrado menores concentraciones de plomo que cadmio (Conti y Botre, 2001; Roman, 2010; Matin *et al.*, 2016). También se han realizado estudios que proponen la incorporación de plomo de la planta a la abeja y sus productos (Cozmuta *et al.*, 2012; Lambert *et al.*, 2012). Burden *et al.*, (2018) encontraron que las abejas presentan alteración de la sensibilidad a la sacarosa después del consumo de plomo a diferencia de otros metales como el cadmio.

BIOACUMULACIÓN

La bioacumulación se define como la concentración de una sustancia química en los tejidos de un organismo; se puede establecer una relación entre las propiedades físico químicas del compuesto y la respuesta fisiológica del organismo (Arnot y Gobas, 2006), de ésta forma, la bioacumulación también dependerá de las características de cada especie y el compuesto con el que esté en contacto (Diener *et al.*, 2015). El compuesto químico que es bioacumulado, puede ingresar al organismo por diversas rutas como la respiración o la ingesta y puede ser eliminado o biotransformado; cuando no se elimina completamente, se acumula en los tejidos del organismo y puede ser tóxico en cierta concentración, alterando las funciones fisiológicas (Diener *et al.*, 2015).

Los compuestos químicos bioacumulativos muchas veces se encuentran como contaminantes, por ejemplo, los suelos se contaminan por la presencia de metales en la superficie, se incorporan a diferentes niveles en la cadena trófica y causan una gran variedad de efectos adversos por acumulación (Bilandzic *et al.*, 2011); también pueden desarrollar toxicidad sobre algunos insectos que bioacumulan los compuestos con los que están en contacto (Al-Waili *et al.*, 2012; Sadeghi *et al.*, 2012). Se ha observado que los metales también pueden ser acumulados por algunos grupos de organismos, aumentando en ciertos

casos, los índices de mortalidad (Sadeghi *et al.*, 2012) y como consecuencia puede haber cambios en el tamaño poblacional (Mogren y Trumble, 2010).

La bioacumulación de contaminantes en abejas depende del consumo de polen y néctar de las flores que visita, ya que ciertos elementos potencialmente tóxicos, se absorben por la raíz y se acumulan en diferentes partes de la planta (Giglio *et al.*, 2017; Davodpour *et al.*, 2019; Desoky *et al.*, 2019).

***Apis mellifera* Y SUS PRODUCTOS COMO BIOINDICADORES**

En las últimas décadas se han realizado estudios acerca de la acumulación de metales pesados en la abeja y sus productos, aportando valiosa información acerca de la calidad del ambiente en el que se desarrollan. Se ha documentado la pérdida de abejas por diversos factores, tales como urbanización, pérdida de hábitat y presencia de contaminantes producidos en actividades humanas (Tiwari *et al.*, 2016; Toth *et al.*, 2016; Abou y Staron, 2019; Andrews, 2019). Los contaminantes pueden adherirse al cuerpo de la abeja durante el vuelo (Roman *et al.*, 2011; Hladun *et al.*, 2013; Negri *et al.*, 2015) o pueden ser ingeridos a través del polen y néctar de las flores (Silici *et al.*, 2013), ya que los contaminantes pueden ser transferidos del suelo a la planta (Davodpour *et al.*, 2019; Desoky *et al.*, 2019), aunque la vía de contaminación más importante en abejas es la exposición del insecto y su colmena, a recursos que utiliza en zonas contaminadas (Cozmuta *et al.*, 2012).

En la actualidad, el uso de los insectos como bioindicadores está ganando creciente interés debido a su enorme diversidad (riqueza y abundancia de especies) y a su papel en el funcionamiento de los ecosistemas (McGeoch, 2007). *Apis mellifera* es un buen indicador biológico, ya que está ampliamente distribuido, los individuos de una colonia se desplazan distancias relativamente grandes y visitan las flores de muchas especies de plantas (i.e., son poliléticas), por lo que los individuos se exponen a numerosos estresores durante sus actividades de polinización y son sensibles a cambios ambientales (Benéteau *et al.*, 2013).

Su cuerpo pubescente puede retener fácilmente residuos atmosféricos y los individuos pueden contaminarse al alimentarse de polen y néctar de flores que crecen en suelos contaminados o al ingerir agua con contaminantes (Lambert *et al.*, 2012; Záric *et al.*, 2016) es por esto que las abejas melíferas y sus productos han sido utilizados para detectar y monitorear niveles de contaminación ambiental por elementos potencialmente tóxicos en diferentes ecosistemas (agrícola, urbano e industrial) (Bratu y



Beorgescu, 2005; Erbilir y Erdogrul, 2005; Sadeghi *et al.*, 2012; Formicki *et al.*, 2013; Lichtfouse *et al.*, 2013; Porrini *et al.*, 2014; Johnson, 2015; Giglio *et al.*, 2017).

La miel es un producto elaborado por las abejas (*Apis mellifera*) a partir del néctar que recolectan de las flores; la composición de este producto dependerá del tipo de flor que visite (Bibi *et al.*, 2008; Ozcan *et al.*, 2012; Islam *et al.*, 2014). La miel es una mezcla de carbohidratos, vitaminas, proteínas y minerales. La importancia de la miel radica en su incorporación a la dieta humana y a que recientemente se ha estudiado la presencia de metales pesados en este producto (Bogdanov, 2006; Nowak *et al.*, 2011; Al Waili *et al.*, 2012; Bilandzic *et al.*, 2012; Panseri *et al.*, 2014).

El propóleo es una mezcla de resinas que la abeja obtiene de los árboles y es utilizado principalmente para protección de la colmena, ya que presenta propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, analgésicas, antifúngicas, antibacteriales y antivirales (Finger *et al.*, 2014), además de tener compuestos fenólicos, terpenos y aminoácidos (Matin *et al.*, 2016). El propóleo ha sido ampliamente utilizado para conocer la calidad ambiental del lugar en el que se encuentra, ya que se obtiene de plantas y árboles, los cuales se encuentran en espacios específicos que pueden ser utilizados como fuentes estacionarias; además, al ser una mezcla pegajosa, los contaminantes se incorporan fácilmente a él (Finger *et al.*, 2014).

La cera es un material utilizado por la abeja para la construcción del panal; ésta es elaborada por las abejas de 12 a 18 días de edad, mediante glándulas de cera localizadas en el abdomen (Black, 2006). La cera es un producto que ha sido utilizado como un método no invasivo para conocer la calidad del ambiente.

JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se ha observado una importante disminución en las poblaciones de abejas *Apis mellifera* a escala global, uno de los factores que intervienen en éste fenómeno es el aumento en los niveles de contaminación en agua, aire y suelo con los que la abeja está en contacto. Al ser las abejas *Apis mellifera*, uno de los principales grupos de polinizadores en el mundo, éste servicio resulta afectado por la disminución de poblaciones de dicho organismo. Se propone como sistema de estudio la abeja *Apis mellifera* presente en el estado de Hidalgo, ya que además de ser un organismo sensible a los cambios medioambientales, presenta un ciclo de vida conocido y relativamente corto, lo cual es fundamental para lograr los objetivos planteados.

Se considera que *Apis mellifera* es uno de los grupos de polinizadores de mayor importancia en la producción de cultivos comestibles y que es la especie de polinizador más utilizada comercialmente en el mundo; es por esto que estos organismos han sido estudiados ampliamente en diferentes países, sin embargo, en México existe escasa información acerca del estado de los polinizadores que permitan determinar y monitorear el estado en el que se encuentra el ambiente. Las regulaciones actuales en México, no especifican límites permisibles de metales pesados en los productos de *Apis mellifera* consumidos por el humano.

Es de gran importancia entender el proceso de incorporación y transferencia de contaminantes presentes en el ambiente y los efectos que ocasionan para obtener información acerca del estado medioambiental que ayude a monitorear el ambiente local. Con la realización de este proyecto se pretende detectar la presencia y concentración de elementos potencialmente tóxicos en los productos de abeja, para establecer medidas que disminuyan los efectos sobre la salud humana y ambiental. Este proyecto ayudará a documentar las condiciones ambientales de los diferentes sitios contemplados en el área de estudio.



CAPÍTULO I

NIVELES DE CADMIO, CROMO Y PLOMO EN ABEJAS (*Apis mellifera*) Y SUS PRODUCTOS EN HIDALGO, MÉXICO

INTRODUCCIÓN

Las abejas de la especie *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) son el grupo de mayor importancia en procesos de polinización y se considera que es el principal proveedor de servicios de polinización de cultivos a nivel mundial, se conoce que cerca del 85% de las especies de plantas que producen frutas y/o semillas para consumo humano en México dependen en algún grado de los polinizadores para una producción eficiente (Ashworth *et al.*, 2009) y *A. mellifera* es la especie de polinizador más utilizada comercialmente en el país (Torres *et al.*, 2013; Frausto *et al.*, 2017). Se ha documentado un considerable número de trabajos que destacan el impacto de la acumulación de metales pesados en abejas, miel, polen, néctar y jalea real que disminuyen su calidad (Lambert *et al.*, 2012; Sadeghi *et al.*, 2012; Hladun *et al.*, 2013; Meindl y Ashman, 2013; García *et al.*, 2016; Giglio *et al.*, 2017).

La pérdida de poblaciones de abejas, ha sido estudiada en los últimos años y puede estar relacionada con la prevalencia de patógenos, pérdida y fragmentación de hábitats, disponibilidad de recurso, así como con la presencia de elementos potencialmente tóxicos (Ashworth *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2013 y Cutler *et al.*, 2014); se ha observado que la acumulación de metales en *A. mellifera* tiene como resultado efectos letales y subletales, principalmente en el desarrollo de larvas y adultos (Johnson *et al.*, 2010; Hladun *et al.*, 2013; Ruschioni *et al.*, 2013; Di *et al.*, 2016; Van der Steen *et al.*, 2016). Estos contaminantes se incorporan a la abeja por adhesión a su cuerpo durante el vuelo o mediante el consumo del néctar para la elaboración de productos como miel, propóleo, cera y jalea real. La relevante disminución de poblaciones de abejas que se ha observado los últimos años, está estrechamente relacionada con el aumento de elementos, muchas veces tóxicos para el insecto (Johnson *et al.*, 2010; Hladun *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2013; y Van der Steen *et al.*, 2016).

El presente trabajo se llevó a cabo en diez sitios dentro de tres zonas con diferente uso de suelo, en el estado de Hidalgo. Como primera zona de estudio, se consideró un área agrícola, dentro del Valle del Mezquital, ya que los suelos agrícolas están relacionados con el incremento de cadmio como resultado del uso intensivo de fertilizantes fosfatados (Jacob *et al.*, 2013; Butt *et al.*, 2018). La siguiente zona corresponde a un área conurbada, en Pachuca de Soto, ya que se ha observado que el plomo y el cadmio se encuentran en mayores concentraciones en áreas urbanas, debido principalmente al tráfico vehicular

(Roman, 2010; Gardiner y Harwood, 2017; Díaz *et al.*, 2019); también se ha observado que la dinámica de los materiales en un área urbana es importante en la presencia de metales ya que existe una mayor concentración de plomo en zonas urbanas con materiales con poca filtración (Murphy *et al.*, 2015). El cromo es un elemento que se encuentra en sitios en donde se desarrollan actividades industriales (Butt *et al.*, 2018) y es uno de los principales elementos potencialmente tóxicos que pueden ser bioacumulados (Paš *et al.*, 2004; Davodpour *et al.*, 2019). Por último, se seleccionó una zona rural con vegetación nativa como zona control, en la Huasteca Hidalguense.

Los metales pesados como el cadmio, cromo y plomo han sido objeto de estudio en diversos trabajos por su importancia toxicológica; la presencia de estos elementos está relacionada con actividades industriales, agrícolas y de urbanización (Li *et al.*, 2009; Kabir *et al.*, 2012; Chabukdhara y Nema 2013; Xiao *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2018). Es de gran importancia entender la cinética ambiental de los contaminantes, así como su biodisponibilidad en el proceso de incorporación a los sistemas biológicos y los efectos a la salud que ocasionan, para contribuir al conocimiento del impacto ambiental y biológico de estos contaminantes. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue cuantificar el contenido de cadmio, cromo y plomo en muestras de abeja, miel, propóleo y cera, mediante técnicas espectroscópicas, en tres zonas con diferente uso de suelo, dentro del estado de Hidalgo, para determinar si existen concentraciones de estos elementos con potencial de riesgo en los organismos y sus productos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

El presente trabajo se llevó a cabo en diez sitios pertenecientes a tres zonas de acuerdo al uso de suelo y a la presencia de actividades apícolas, en el estado de Hidalgo (Tabla 1) (Figura 1).

ZONA AGRÍCOLA, El Valle del Mezquital es una macrorregión con 7,065.04 km², compuesta por 28 municipios, con clima semiárido y en donde predomina la actividad agrícola principalmente de maíz blanco, amarillo y forrajero con sistema de riego y temporal (INEGI, 2017). Se eligieron seis sitios dentro de esta zona (Atitalaquia, Almoloya, Mixquiahuala de Juárez, Progreso de Obregón, Tepeji del Río y Tezontepec de Aldama), con antecedentes de contaminación por elementos potencialmente tóxicos asociados al cultivo de riego con aguas residuales.

ZONA URBANA, La zona metropolitana de Pachuca es un área urbana que contempla siete municipios en 1,358.8 km² (INEGI, 2017). En ésta zona se llevan a cabo actividades humanas, como tráfico vehicular,

así como incineración de desechos que llegan al relleno sanitario municipal, muy cercano a los sitios seleccionados; “El Huixmi”, en el municipio de Pachuca de Soto.

ZONA RURAL CON VEGETACIÓN NATIVA, La huasteca hidalguense cuenta con un clima templado con amplias áreas boscosas de cedro y pino, sin ninguna fuente de contaminación aparente; está ubicada dentro de la Sierra Madre y contempla 15 municipios, de los cuales, dos fueron seleccionados para este estudio: Huejutla (ITHS y El Cerro) y San Felipe Orizatlán (Madueño, 2000).

Tabla 1. Sitios de muestreo de acuerdo al uso de suelo en el estado de Hidalgo.

Uso de suelo	No.	Sitios	Coordenadas		Altitud m.s.n.m
Zona rural con vegetación nativa	1	ITSH Huejutla	21° 09' 13" N	98° 23' 14" O	115
	2	El Cerro Huejutla	21° 09' 25" N	98° 22' 13" O	185
	3	Ahuatitla San Felipe Orizatlán	21° 09' 53" N	98° 40' 00" O	228
Urbano	4	El Huixmi, Pachuca	20° 03' 45" N	98° 49' 12" O	2,443
	5	Atitalaquia	20° 04' 32" N	99° 13' 49" O	2,080
	6	Almoloya	19° 41' 19" N	98° 23' 40" O	2,525
Agrícola	7	Mixquiahuala	20° 13' 44" N	99° 12' 54" O	2,004
	8	Progreso de Obregón	20° 15' 38" N	99° 11' 32" O	1,944
	9	Tepeji del río	19° 53' 41" N	99° 19' 46" O	2,215
	10	Tezontepec de Aldama	20° 09' 59" N	99° 17' 26" O	2,034

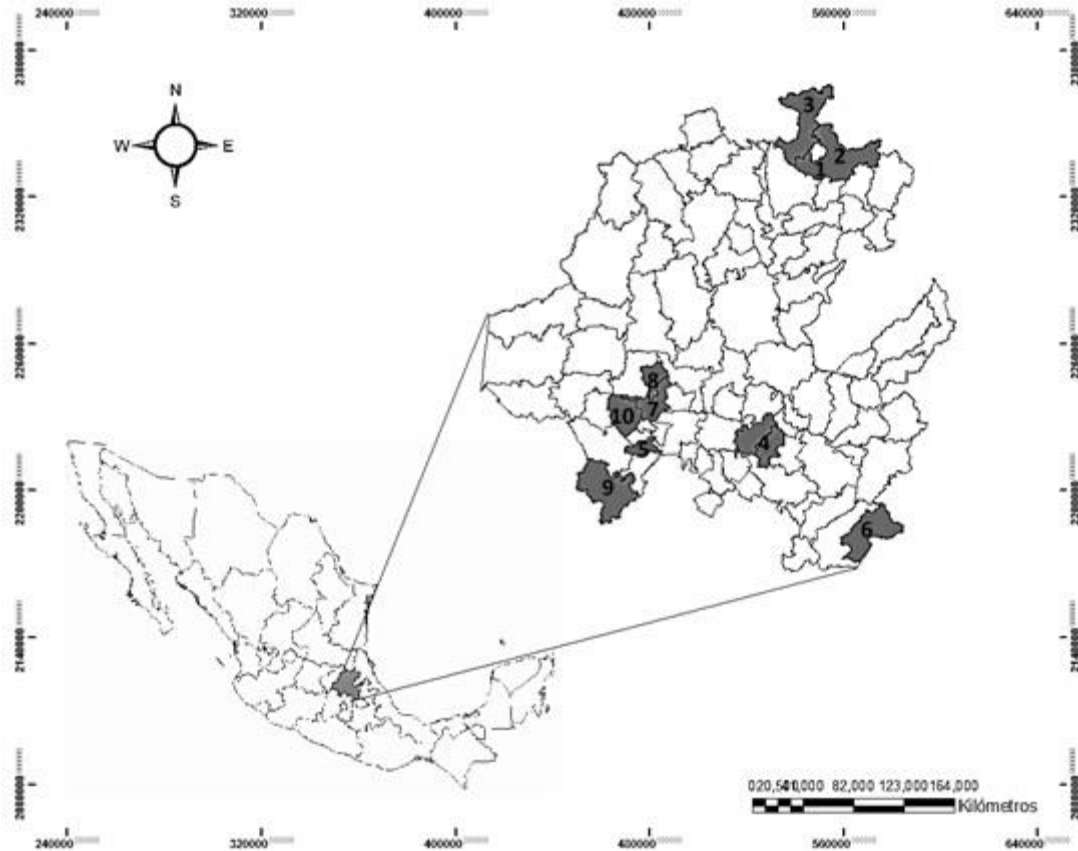


Figura 1. Mapa del estado de Hidalgo que muestra los sitios seleccionados dentro del área de estudio (1. ITSH; 2. El Cerro; 3. San Felipe; 4. El Huixmi; 5. Atitalaquia; 6. Almoloya; 7. Mixquiahuala; 8. Progreso; 9. Tepeji; 10. Tezontepec).

En cada uno de los diez sitios existe actividad apícola y se eligió un apiario por sitio para la obtención de muestras.

COLECTA DE MUESTRAS

Las colectas se realizaron en campo en junio de 2015, de la siguiente manera:

Abejas. En cada apiario, se colectaron quince adultos vivos de *Apis mellifera*, tomados directamente de cada colmena y transportados en frascos cerrados hasta el laboratorio (Fakhimzadeh y Lodenius, 2000), en donde se congelaron a -18°C para su conservación (Giglio *et al.*, 2017).

Miel. se colectó con espátula de teflón directamente de la colmena, 10 g de miel madura por apiario (Roman *et al.*, 2011).

Propóleo y cera. Se raspó manualmente con espátula de teflón, la superficie interna del apiario para la obtención de 5 g de propóleo y 5 g de cera (Formicki *et al.*, 2013).

Todas las muestras se trasladaron al laboratorio, para realizar los análisis posteriormente (Giglio *et al.*, 2017).

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Digestión de muestras. Las abejas se secaron a 60 °C en estufa Lab Oven durante 72 h hasta obtener peso constante, se trituraron en mortero y se homogenizó la cantidad necesaria para analizar cada muestra por triplicado. La miel se llevó a cenizas primero calentando las muestras en una flama con mechero Bunsen y posteriormente calentando en una mufla a 800 °C (Fredes y Montenegro, 2006). Se pesaron muestras de 0.05 g de cenizas, 0.1 g de abejas secas, 0.1 g propóleo y 0.1 g cera, en vasos de polipropileno para microondas, se adicionaron 5 mL de agua desionizada, 2 mL de HNO₃ y 1 mL de H₂O₂ en cada una de las muestras (Gutiérrez *et al.*, 2015); se digirieron las muestras en horno de microondas Marca CEM modelo MARS 5 mediante calentamiento de muestras a 190 °C y 190 psi en 25 min, manteniéndose la temperatura y la presión por 15 min a 190 °C y 190 psi y posteriormente se enfriaron durante 10 min. Las muestras se llevaron a un volumen final de 10 mL con agua desionizada. La determinación de metales totales presentes en las muestras se realizó en un espectrofotómetro de plasma por acoplamiento inductivo de la marca Perkin Elmer modelo Optima 8000, USA. Se realizó la curva de calibración para cada uno de los elementos de interés preparada de un estándar multi elemental (Anexo 1). La concentración de los elementos en las muestras se determinó utilizando la ecuación 1:

$$Cr = \frac{Cl}{Pm} \times Va \times Fd$$

Dónde: **Cr**: concentración real dada en $\mu\text{g g}^{-1}$ **Cl**: concentración leída en el espectrofotómetro de plasma ($\mu\text{g g}^{-1}$); **Var**: volumen de aforo expresado en L; **Pm**: peso de la muestra y **Fd**: factor de dilución.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Una vez obtenidos los resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para conocer si existen diferencias significativas entre las concentraciones de metales encontradas en las muestras de cada zona estudiada ($p < 0.05$) La normalidad de los datos se verificó con la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. Los datos fueron analizados con el programa Sigma Stat 3.5.

RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados de las concentraciones de cadmio (Tabla 2), cromo (Tabla 3) y plomo (Tabla 4) encontradas en las abejas y sus productos en las tres zonas estudiadas.

La mayor concentración de cadmio fue de $8.28 \mu\text{g g}^{-1}$ en abejas de la zona urbana. Al obtener el promedio de las concentraciones, se observó que difiere significativamente de las de la zona rural con vegetación nativa que aparente no está contaminada. Las concentraciones de cadmio en las muestras de propóleo de la zona urbana muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto a las de la zona agrícola y rural; la mayor concentración de cadmio en propóleo fue de $4.29 \mu\text{g g}^{-1}$ en la zona urbana y difiere significativamente con las concentraciones promedio determinadas en las zonas agrícola y rural.

La concentración de cromo más alta que se determinó en las muestras de abejas fue de $3.93 \mu\text{g g}^{-1}$ y en propóleo de $4.52 \mu\text{g g}^{-1}$ de la zona agrícola, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al compararlas con las otras zonas estudiadas, en miel y cera no se detecta la presencia de cromo.

Para el caso del plomo, las concentraciones más altas fueron encontradas en las muestras de abeja $3.76 \mu\text{g g}^{-1}$ y propóleo $4.75 \mu\text{g g}^{-1}$ de la zona agrícola, sin embargo, no se presentan diferencias al compararlas con las zonas urbana y rural; las concentraciones de plomo en miel de la zona urbana son estadísticamente diferentes con las de la zona rural, la mayor concentración de plomo en miel fue de $2.76 \mu\text{g g}^{-1}$ de la zona urbana.

Tabla 2. Concentración de cadmio en abejas y sus productos en el estado de Hidalgo.

Muestra	Parámetro	Concentración de Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
		Agrícola	Urbana	Rural
<i>Abeja</i>	<i>Media</i>	1.69±0.43ab	5.43±2.85a	0.39±0.03b
	<i>Mínimo</i>	0.44	2.58	0.33
	<i>Máximo</i>	2.85	8.28	0.42
	<i>N</i>	6	2	3
<i>Miel</i>	<i>Media</i>	0.006±0.005	<LD	<LD
	<i>Mínimo</i>	0.001	<LD	<LD
	<i>Máximo</i>	0.02	<LD	<LD
	<i>N</i>	4	3	3
<i>Propóleo</i>	<i>Media</i>	0.91±0.16b	3.87±0.60a	0.64±0.01b
	<i>Mínimo</i>	0.4	3.18	0.63
	<i>Máximo</i>	1.67	4.29	0.65
	<i>N</i>	7	3	3
<i>Cera</i>	<i>Media</i>	0.26±0.07	0.18±0.06	0.33±0.15

	Mínimo	0.001	0.13	0.18
	Máximo	0.46	0.25	0.62
	N	6	3	3

<LD=debajo de los límites de detección. Letras en cada dato representan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 3. Concentración de cromo en abejas y sus productos en el estado de Hidalgo.

Muestra	Parámetro	Concentración de Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
		Agrícola	Urbana	Rural
Abeja	Media	1.49±0.83	3.77±2.38	<LD
	Mínimo	0.001	0	<LD
	Máximo	3.93	3.77	<LD
	N	6	2	3
Miel	Media	<LD	<LD	<LD
	Mínimo	<LD	<LD	<LD
	Máximo	<LD	<LD	<LD
	N	4	3	3
Propóleo	Media	1.7±0.58	2.32±0.43	2.42±1.17
	Mínimo	0.001	2.04	1.08
	Máximo	4.52	2.82	4.74
	N	7	3	3
Cera	Media	<LD	<LD	1.12±0.51
	Mínimo	<LD	<LD	0.001
	Máximo	<LD	<LD	4.47
	N	3	3	4

<LD= debajo de los límites de detección. Letras en cada dato representan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4. Concentración de plomo en abejas y productos en el estado de Hidalgo.

Muestra	Parámetro	Concentración de Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
		Agrícola	Urbana	Rural con vegetación nativa
Abeja	Media	1.95±0.56	3.14±0.1	1.24±0.22
	Mínimo	0.001	3.04	0.9
	Máximo	3.76	3.23	1.66
	N	6	2	3
Miel	Media	0.86±0.32 ^{ab}	2.38±0.4 ^a	0.20±0.01 ^b
	Mínimo	0.29	1.98	0.18
	Máximo	1.75	2.76	0.22
	N	4	3	3
Propóleo	Media	1.50±0.61	<LD	1.48±0.39
	Mínimo	0.001	<LD	0.71

	Máximo	4.75	<LD	1.94
	N	7	3	3
Cera	Media	0.65±0.48	0.20±0.03	1.09±0.9
	Mínimo	0.001	0.18	0.001
	Máximo	2.88	0.24	3.28
	N	6	3	3

<LD= por debajo de los límites de detección. Letras en cada dato representan diferencias estadísticamente significativas.

(Ver Anexo 2)

DISCUSIÓN

ABEJA

Al analizar las concentraciones de los tres metales pesados (Cd, Cr y Pb) en abejas, se observó que cumplen un patrón, urbanas> agrícolas> zona rural con vegetación nativa, esto confirma lo publicado por Ozcan *et al.*, (2012) y Lambert *et al.*, (2012), quienes reportaron mayores concentraciones de metales en abejas de ambientes contaminados con respecto a menos contaminados. Las concentraciones de Cr estuvieron por debajo de los límites de detección del equipo en los sitios con escasa contaminación, lo que indica que el nicho que ocupan estos organismos no representa un riesgo de toxicidad en ellos.

Los niveles de metales en las muestras de abejas del presente estudio, se encuentran en el rango reportado en la literatura (Ramírez, 2002; Zhou *et al.*, 2018; Desoky *et al.*, 2019; Goretti *et al.*, 2019). Roman *et al.*, (2010), no mencionaron efectos adversos con las concentraciones obtenidas, sin embargo, se sugiere continuar monitoreando las abejas de las áreas de estudio. Se ha observado que en sitios contaminados las abejas pueden interceptar contaminantes atmosféricos que se adhieren a su cuerpo y obtener polen con ciertos contaminantes por la transferencia del suelo a la planta (Davodpour *et al.*, 2019; Desoky *et al.*, 2019). A pesar de que el Cd y Cr se acumulan en el suelo de zonas agrícolas mediante los fertilizantes fosfatados (Ramírez, 2002), en la ciudad, algunas actividades humanas como la pirotecnia, y procesos de combustión pueden generar e incrementar las concentraciones de metales en el ambiente. Uno de los sitios seleccionados en ésta zona, se encuentra muy cerca del relleno sanitario de la ciudad; se han encontrado mayores concentraciones de cadmio y plomo en zonas cercanas a desechos (Islam *et al.*, 2015), esto puede deberse a la incineración de residuos o a la presencia de desechos electrónicos.

En algunos estudios se han presentado efectos de los metales como disminución de tamaño poblacional de organismos del suelo (Wahl *et al.*, 2012), en la diversidad y abundancia de abejas silvestres (Moron *et al.*, 2012) y en la densidad de ácaros y colémbolos (Santamaría *et al.*, 2012). En el país se tiene escasa

información acerca del estado de los polinizadores y la disminución de sus poblaciones. En las zonas estudiadas en el presente trabajo, no existe información que documente los efectos de metales en las poblaciones de abejas.

El Cd estuvo presente en mayores concentraciones en abejas con respecto a los otros metales, esto puede deberse a que el cadmio es considerado un metal biopersistente (Wahl *et al.*, 2012) con gran capacidad de mantener sus propiedades fisicoquímicas en el ambiente y por tanto con alta disponibilidad para tomar parte en las cadenas alimenticias. Se encontraron mayores concentraciones de cadmio y cromo en abejas que en miel en las diferentes zonas, esto puede deberse a lo propuesto por Dzugan *et al.*, (2018), quien menciona que la abeja puede hacer la función de “biofiltro” de metales tóxicos que evitan la contaminación en miel, a pesar de la biodisponibilidad de éstos.

MIEL

La miel es un producto natural elaborado por la abeja a partir del néctar y sus características dependen del tipo de flor que la abeja visita, así como factores climáticos y composición del suelo, pero también esto puede intervenir en las concentraciones de metales que se encuentran en la miel (Díaz *et al.*, 2019). Los niveles de Cd y Cr en muestras de miel se encontraron por debajo de los límites de detección del equipo.

A pesar de que las muestras de miel analizada en las diferentes zonas presentan bajas concentraciones (<LD) de cadmio y cromo, las concentraciones de plomo en muestras de miel de las tres zonas, se encontraron excediendo los niveles permisibles para consumo humano ($0.1 \mu\text{g g}^{-1}$); de acuerdo con Kalbande *et al.*, (2008) y Boyd *et al.*, (2010), la miel puede acumular contaminación si el polvo metálico del aire se asienta por deposición atmosférica, se diluye con agua de lluvia contaminada o el néctar tiene metales que la planta absorbe del suelo. Ruschioni *et al.*, (2013), mencionan que es importante el tipo de miel que se toma para la muestra, ya que la variación de agua entre una miel madura y una joven, puede repercutir en la variación de la concentración de metales, una miel madura puede presentar hasta un 33.3 % menos de metales pesados (Roman, 2010).

Se detectó una baja concentración de metales en miel en la mayoría de los sitios de muestreo, lo cual concuerda con lo mencionado en el trabajo de Fakhimzadeh y Lodenius (2000), en el que se reporta poca o nula cantidad de metales pesados en muestras de miel. Las concentraciones de Cd encontradas en miel, están dentro de los límites permisibles de la Norma Internacional (Brasil $0.50 \mu\text{g g}^{-1}$ y Suiza $0.03 \mu\text{g g}^{-1}$ en jarabes y zumos naturales; Polonia $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ en miel). Sin embargo, la miel de las tres zonas, de

acuerdo con las normas internacionales, se encuentra contaminada por plomo, ya que excede el límite permisible ($0.1 \mu\text{g g}^{-1}$) establecido por el codex alimentario de Polonia (2012), esto podría deberse al origen botánico de la miel, a la composición del suelo o incluso a los instrumentos utilizados en la práctica apícola (Perna *et al.*, 2012).

(Anexo 3).

PROPÓLEO

El propóleo es una resina producida por las abejas tras la mezcla de sustancias recogidas de plantas en brotes, botones florales y exudados resinosos, usados para la protección de la colmena y es un producto altamente utilizado con fines terapéuticos (López *et al.*, 2016); sus características lo hacen ser un material pegajoso y esto puede contribuir a la incorporación de contaminantes atmosféricos (Matin *et al.*, 2016), por lo que es importante su estudio.

El Cd estuvo presente en las muestras de propóleo de las tres zonas; las concentraciones variaron en las zonas urbana>agrícola>rural y se encontró que la zona urbana presenta diferencias significativas con respecto a agrícola y rural. La mayor concentración de Cd en propóleo ($3.87 \mu\text{g g}^{-1}$) se encontró en la zona urbana. Las concentraciones de Cd encontradas son mayores que las reportadas por Finger *et al.*, (2014), quien estudió la presencia de metales en propóleo de Brasil.

Las concentraciones de Cr en propóleo de todas las zonas estudiadas, son superiores al límite permisible en alimentos de acuerdo con las normas brasileñas ($0.1 \mu\text{g g}^{-1}$). La mayor concentración de Cr ($4.74 \mu\text{g g}^{-1}$), se encontró en muestras de propóleo de la zona rural con vegetación nativa, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con las otras zonas estudiadas.

Las concentraciones de Pb en las muestras de propóleo de la zona urbana se encontraron por debajo de los límites de detección. La mayor concentración de Pb ($4.75 \mu\text{g g}^{-1}$), se encontró en la zona agrícola, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las zonas estudiadas. Las concentraciones de Pb coinciden con las reportadas por Formicki *et al.*, (2013), quienes estudiaron la presencia de metales en abeja y sus productos en Polonia.

El propóleo constituye una técnica importante de muestreo para contribuir con información en aquellas épocas en las que no se pudiera recoger néctar ya que representa la incorporación de metales a la vegetación del entorno (Gutiérrez *et al.*, 2005).

CERA

De acuerdo con Gutiérrez *et al.*, (2005), la cera es probablemente más útil para detectar compuestos lipófilos que metales pesados, sin embargo, al formar parte de la biología de la especie, es importante tomar en cuenta la información que aporta, en el presente estudio los tres metales (Cd, Cr y Pb) estuvieron presentes en las muestras de cera.

Las concentraciones de Cd fueron mayores en las muestras de cera de la zona rural con vegetación nativa, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las zonas estudiadas.

El Cr se encontró por debajo de los límites de detección en las muestras de cera de las zonas agrícola y urbana. La zona rural presenta la mayor concentración de Cr ($4.47 \mu\text{g g}^{-1}$), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre zonas.

Se encontró una mayor concentración de Pb en las muestras de cera de la zona rural con vegetación nativa, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las zonas estudiadas. Al igual que en propóleo, las concentraciones encontradas en muestras de cera, corresponden a lo reportado por Formicki *et al.*, (2013) en productos de abeja de Polonia. Los niveles de metales encontrados en las muestras se encuentran dentro del rango reportado por Conti y Botre (2001), en el área metropolitana de la ciudad de Roma; el presente estudio concuerda con el patrón de concentración de metales que ellos reportan (Pb > Cr > Cd).

Se sugiere que la presencia de contaminantes en muestras de cera, puede estar relacionada con las prácticas apícolas, ya que Taha *et al.*, (2010), asocia valores mayores de elementos traza en miel y cera de panales reutilizados por más de 4 años. Por lo tanto, en estudios futuros sería conveniente considerar el origen, calidad y tiempo de la cera en la colmena. A pesar de no ser un producto con riesgo toxicológico, ya que no es consumido por el hombre, la cera puede usarse como un método no invasivo de detección de metales.

CONCLUSIÓN

El presente estudio permitió comprobar la presencia y concentración de Cd, Cr y Pb en abejas, miel, propóleo y cera, en las zonas con diferentes grados de perturbación. Hasta el momento, las publicaciones en México sobre metales pesados en abejas y sus productos, aún son limitadas; así mismo, la normatividad y parámetros permisibles para la miel, propóleo y cera en México, son nulos. Es necesario continuar con el monitoreo de metales pesados en particular los de mayor importancia toxicológica, así mismo, es indispensable abarcar mayor área de estudio, con la finalidad de contemplar algunas otras problemáticas como la minería y actividades industriales, para evitar afectaciones humanas y efectos sobre el medio ambiente.

Apis mellifera puede servir como bioindicador para la detección y monitoreo de los agentes causantes de contaminación como los metales pesados, buscando entender los procesos para incluir medidas de remediación que mejoren la calidad de los factores ambientales. Es de gran importancia la información aportada por el presente trabajo, para detectar con exactitud la presencia y concentración de elementos potencialmente tóxicos en los productos de abeja, para establecer medidas que disminuyan los efectos sobre la salud humana y ambiental.

Por último, no existe información acerca de la situación actual de las poblaciones de *A. mellifera* en el estado de Hidalgo, por lo que los resultados aquí presentados forman parte de un aporte a la información base que permita conocer el estado actual de *A. mellifera*, así como para regular los límites permisibles de los elementos estudiados en los productos de abeja consumidos por el hombre en México.

CAPITULO II

PRESENCIA DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS (CADMIO, CROMO Y PLOMO) EN ABEJAS A LO LARGO DE UN GRADIENTE DE URBANIZACIÓN

INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas han tenido un aumento acelerado en las últimas décadas. A escala mundial, procesos industriales, agrícolas y de urbanización, han tenido como consecuencia la presencia de contaminantes que originan la disminución de poblaciones y efectos fisiológicos y conductuales en algunos grupos de organismos (Benéteau *et al.*, 2013; Al Naggar *et al.*, 2013; Badawy *et al.*, 2014; Barganska *et al.*, 2015; Johnson, 2015). Los sistemas bióticos tienden a reaccionar a cambios ambientales, ya que sus funciones dependen de los recursos que les brinda el ambiente en el que se desarrollan, respondiendo significativamente a los contaminantes presentes. La respuesta que muestran algunos grupos de organismos es tan importante, que sirven como indicadores que ayudan a la detección y monitoreo de los agentes causantes de contaminación en diferentes ambientes (Creamer *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2014; Van der Steen *et al.*, 2016).

Los ambientes urbanos han sido definidos como mosaicos de superficies impermeables y permeables que comúnmente contienen hábitats perturbados (Fortel *et al.*, 2014). En estos ambientes, las áreas verdes se ven reducidas y han sido reemplazadas por una cobertura de superficies impermeables que incluyen construcciones, caminos y zonas industriales (Moron *et al.*, 2012).

En las zonas urbanas los metales pesados generalmente se encuentran en elevadas concentraciones en los sitios con mayor actividad industrial o tráfico vehicular pudiendo afectar negativamente a la flora y fauna presentes (Charlesworth *et al.*, 2010).

En la actualidad, el uso de los insectos como bioindicadores está ganando creciente interés debido a su enorme diversidad (riqueza y abundancia de especies), su sensibilidad a los cambios ambientales y a su papel en el funcionamiento de los ecosistemas (McGeoch, 2007). *Apis mellifera* es un buen indicador biológico, ya que está ampliamente distribuido, los individuos de una colonia se desplazan distancias relativamente grandes y visitan flores de un gran número de especies de plantas, por lo que los individuos se exponen a numerosos estresores durante sus actividades de polinización y son sensibles a cambios ambientales (Benéteau *et al.*, 2013). Su cuerpo pubescente puede retener fácilmente residuos atmosféricos

y los individuos pueden contaminarse al alimentarse de polen y néctar de flores que crecen en suelos contaminados o al ingerir agua con contaminantes (Lambert *et al.*, 2012). Las abejas han sido empleados en estudios con el objetivo de determinar el nivel de contaminación por metales en diferentes ecosistemas (agrícola, urbano e industrial) (Bratu y Beorgescu, 2005).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Cuantificar el contenido de cadmio, cromo y plomo en diferentes especies de abejas, mediante técnicas espectroscópicas, para determinar si existen concentraciones de riesgo de estos elementos en los organismos y conocer si existen diferencias en las concentraciones en un gradiente de urbanización.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer las concentraciones cadmio, cromo y plomo en abejas, para evaluar diferencias significativas entre niveles de urbanización.
- Comparar las concentraciones cadmio, cromo y plomo en abejas de especies nativas y exótica, para evaluar diferencias significativas entre especies.

METODOLOGÍA

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Se seleccionaron once sitios dentro de los municipios de Pachuca y Mineral de la Reforma, en el estado de Hidalgo, con ayuda de una imagen satelital (Worldview-2 Standard Bundle, con 4 bandas multiespectrales, 0.5 m de resolución, tomada de Sánchez-Echeverría, 2017), digitalizados con el programa ArcGis 10.1. Se determinaron tres zonas de acuerdo al grado de urbanización: zona con urbanización alta (67-90 % de cobertura de superficie impermeable), media (33-66 % de cobertura de superficie impermeable) y baja (0-32 % de cobertura de superficie impermeable) (Figura 2), en base al porcentaje de cobertura impermeable (presencia de materiales que impiden la infiltración del agua), el cual se cuantificó en buffers de 500 m de radio alrededor de las plantas muestreadas, en las cuales se colectaron directamente individuos de abejas que visitaban la vegetación presente (matorral xerófilo).

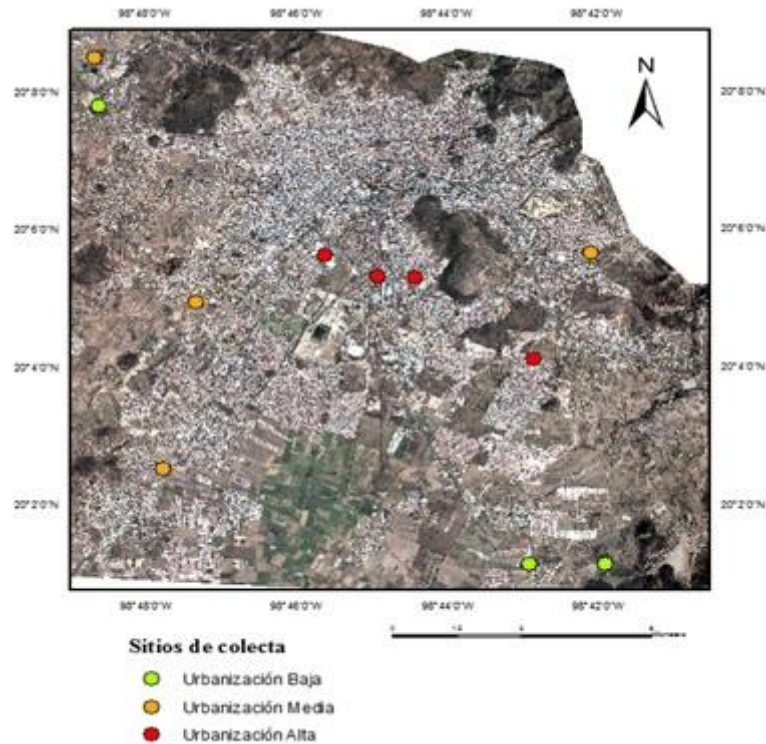


Figura 2: Mapa del estado de Hidalgo que muestra los sitios seleccionados dentro del área de estudio.

TRABAJO EN CAMPO

COLECTA DE MUESTRAS.

Las colectas se realizaron en campo, capturando directamente abejas que visitaban la vegetación presente en un área de 100 m² dentro de cada sitio, con diferente grado de urbanización. En cada sitio se realizaron tres visitas y se colectaron abejas durante 20 minutos; se colectaron adultos vivos de abejas que visitaran la vegetación. Posteriormente se transportaron en frascos cerrados dentro de una hielera hasta el laboratorio.

TRABAJO EN LABORATORIO

Con ayuda de claves taxonómicas y con base en los ejemplares de la colección de referencia del laboratorio de Interacciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, se determinó la especie a la que pertenecían. Posteriormente los individuos colectados e identificados se congelaron a -18°C para su conservación (Giglio *et al.*, 2017).

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

DIGESTIÓN DE MUESTRAS.

Las abejas se secaron a 60 °C en estufa Lab Oven durante 72 h hasta obtener peso constante, se trituraron en mortero y se homogenizó la cantidad necesaria para analizar cada muestra por triplicado. Se pesaron muestras de 0.1 g de abejas secas y se colocaron en vasos de polipropileno para microondas, se adicionaron 5 mL de agua desionizada, 2 mL de HNO₃ y 1 mL de H₂O₂ en cada una de las muestras (Gutiérrez *et al.*, 2015); se siguió la metodología utilizada en el capítulo anterior (página 17). Se realizó la curva de calibración para cada uno de los elementos de interés preparada de un estándar multi elemental (Anexo 1). La concentración de los elementos en las muestras se determinó utilizando la ecuación 1:

$$Cr = \frac{Cl}{P_m} \times V_a \times F_d$$

Dónde: **Cr**: concentración real dada en µg g⁻¹ **Cl**: concentración leída en el espectrofotómetro de plasma (µg g⁻¹); **V_a**: volumen de aforo expresado en L; **P_m**: peso de la muestra y **F_d**: factor de dilución.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Una vez obtenidos los resultados de las concentraciones encontradas en las muestras se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para conocer si existen diferencias significativas entre las concentraciones de metales encontradas en cada zona estudiada (p<0.05) y entre especies de abeja. La normalidad de los datos se verificó con la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. Los datos fueron analizados con el programa Sigma Stat 3.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las abejas capturadas en los sitios de muestreo correspondieron a tres especies (Figura 3).



Apis mellifera



Diadasia sp.



Lithurgus littoralis

Figura 3. Especies encontradas en el gradiente de urbanización en la zona metropolitana de Pachuca, *Apis mellifera* (exótica), *Diadasia* sp. y *Lithurgus littoralis* (nativas). (Fotografía: Montiel-Pimentel y Sánchez-Echeverría, 2016)

Se procesaron y analizaron en total 45 muestras colectadas en julio de 2016. Se realizó el análisis multielemental. De las muestras analizadas, se encontró mayor concentración de cadmio y cromo en las abejas de la especie *Diadasia* sp. que, en las otras dos especies de abejas, aunque la diferencia entre las tres especies no fue significativa para ninguno de los dos metales ($p > 0.05$) (Figura 4). Las concentraciones de plomo en las muestras analizadas, se encontraron por debajo de los límites de detección (<LD).

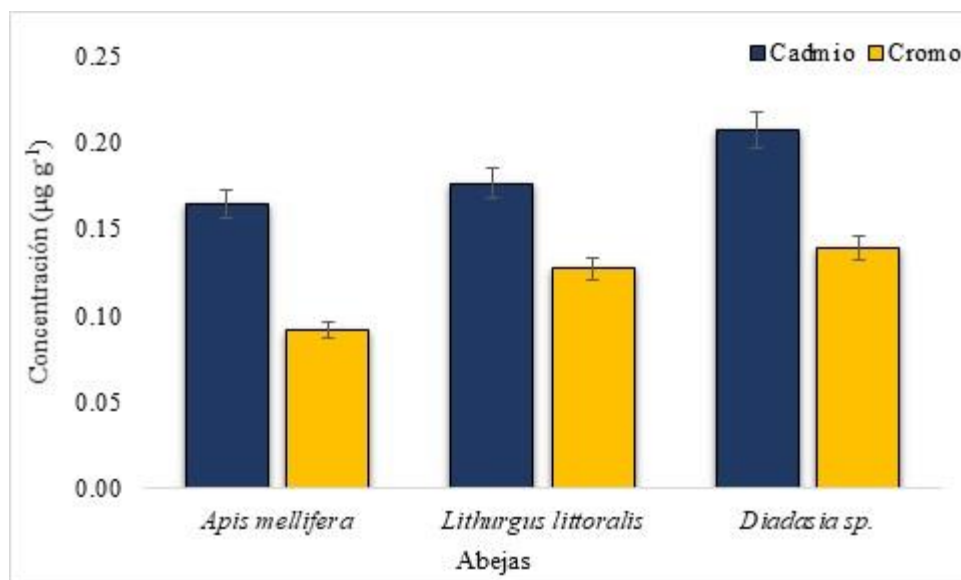





Figura 4. Concentraciones promedio de cadmio y cromo (\pm error estándar) en tres especies de abejas, *Apis mellifera*, *Diadocia sp* y *Lithurgus littoralis*.

El hecho de que no se hayan encontrado diferencias significativas entre las concentraciones presentes en las tres especies estudiadas puede deberse a que los organismos presentan concentraciones similares por presentar un tamaño similar, así como por las características del sitio y los hábitos propios de las especies, ya que pueden utilizar el mismo recurso que les brindan las plantas que visitan, exponiéndose a los contaminantes presentes.

A pesar de no presentar diferencias significativas, *Diadocia sp.* presenta mayor concentración de cadmio y cromo, lo cual puede deberse a que es la especie que tiene mayor cantidad de pubescencia de las tres (Tabla 5), lo cual puede explicar que la cantidad de pelos puede estar relacionada con la cantidad de contaminantes que se adhieren al organismo durante el vuelo, como se ha sugerido en otros estudios (Negri *et al.*, 2015).

Tabla 5. Tamaño e imagen de las tres especies analizadas (*Apis mellifera*, *Lithurgus littoralis* y *Diadasia* sp.) (Michener *et al.*, 2007). (Fotografías: NaturaLista, 2020; Mary Paul, 2007; BEEC, 2020)

Especie	Tamaño	Pubescencia
<i>Apis mellifera</i>	7-19 mm 11.86 ± 0.43 Social	
<i>Lithurgus littoralis</i>	8-19 mm 14.54 ± 1.45 Solitaria	
<i>Diadasia</i> sp.	5-20 mm 12.41 ± 0.37 Solitaria	

La mayor concentración de cadmio total en las tres especies de abejas, fue encontrada en los sitios con urbanización media, mientras que la concentración de cromo fue mayor en sitios con alta urbanización (Figura 5) y disminuyó en sitios con urbanización menor, sin embargo, las diferencias no fueron significativas entre los sitios ($P > 0.05$). Se encontró una mayor concentración de cadmio en las tres especies de abejas en los sitios con urbanización alta (Figura 5), sin embargo, las diferencias no fueron significativas entre los sitios estudiados ($P > 0.05$).

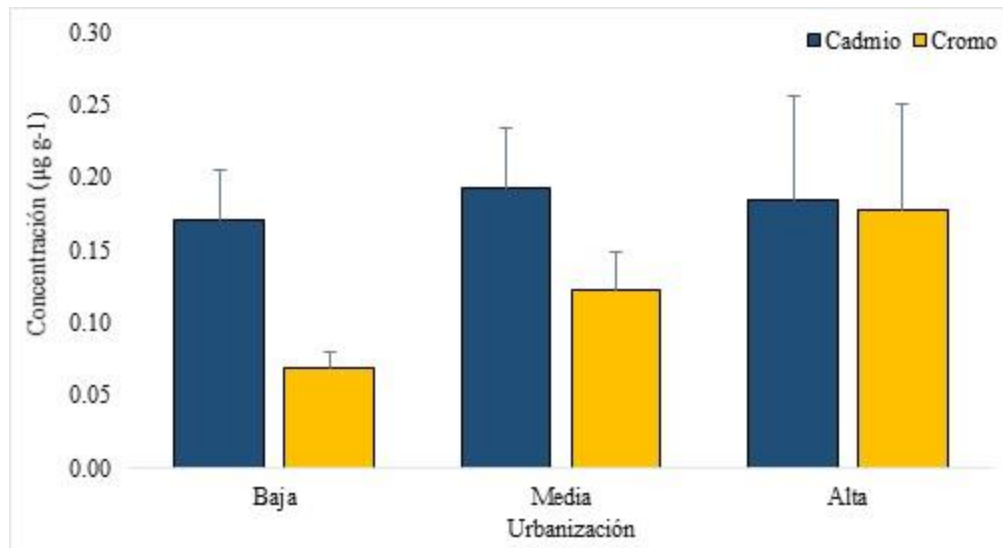


Figura 5. Concentraciones promedio de cadmio y cromo (\pm error estándar) encontradas en abejas de sitios con diferente grado de urbanización.

Al comparar las concentraciones de los metales en cada especie de abeja a lo largo del gradiente de urbanización no se encontró que las concentraciones de cadmio difirieran significativamente para ninguna de las tres especies ($p > 0.05$). Sin embargo, sí se encontró que la concentración de cromo difirió significativamente en el gradiente de urbanización para algunas de las tres especies de abejas. La concentración de cromo en *Apis mellifera* y *Lithurgus littoralis* difirieron significativamente entre las zonas con diferente grado de urbanización ($F_{16-2} = 7.675$, $P = 0.006$; Figura 6 y $F_{11-2} = 6.651$, $P = 0.017$; Figura 7, respectivamente). La concentración de cromo en *Diadasia* sp. no difirió entre las zonas con diferente grado de urbanización ($P > 0.05$).

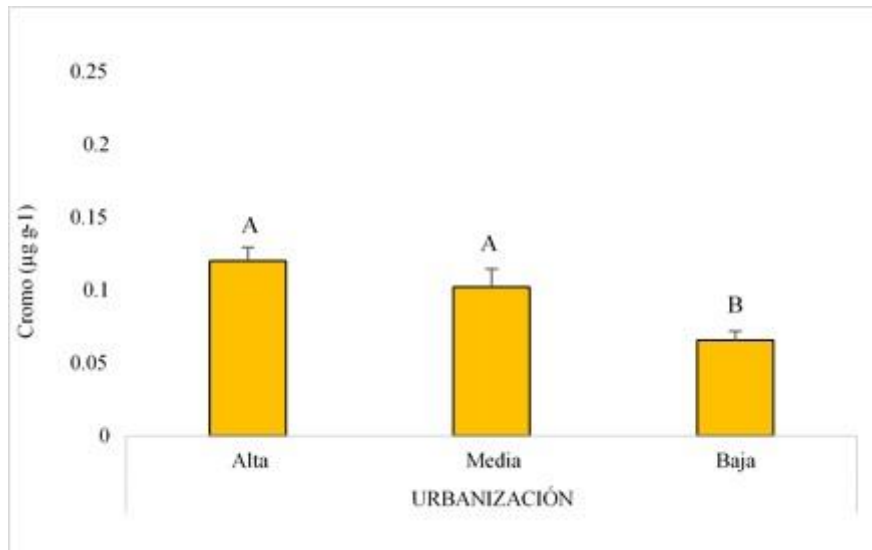


Figura 6. Concentración promedio de cromo (\pm error estándar) encontrada en *Apis mellifera* en sitios con diferente grado de urbanización. Diferentes letras denotan diferencias significativas entre sí ($P < 0.05$).

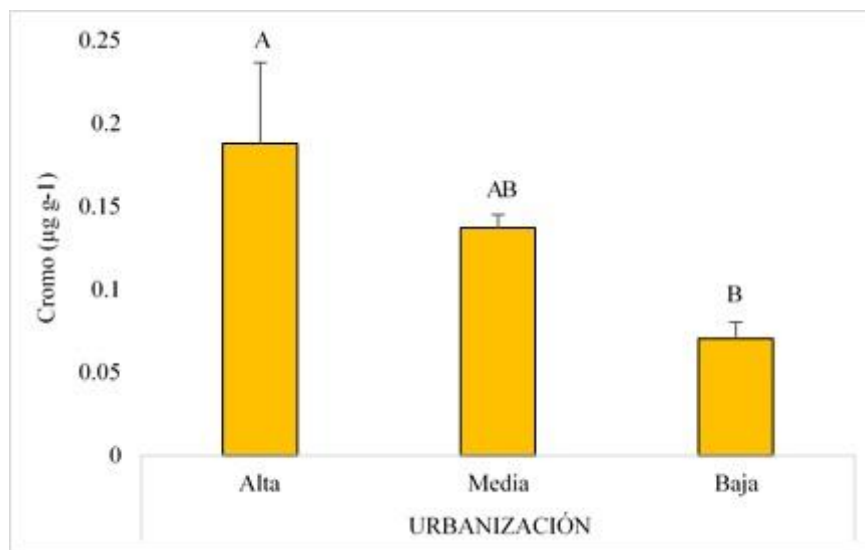


Figura 7. Concentración promedio de cromo (\pm error estándar) encontrada en *Lithurgus littoralis* en sitios con diferente grado de urbanización. Diferentes letras denotan diferencias significativas entre sí ($P < 0.05$).

La presencia de cromo está relacionada con la generación de desechos de productos industriales, tales como baterías, pigmentos, aditivos, así como industria textil, combustión de carbón, tráfico vehicular y otras actividades realizadas por el hombre (Becerra *et al.*, 2014). Por lo tanto, es probable que los sitios

más urbanizados de la zona metropolitana de Pachuca presenten una mayor concentración de cadmio en el suelo y en los cuerpos de agua, y éste haya llegado a las abejas presentes en cada zona, particularmente a *Apis mellifera* y *Lithurgus littoralis*.

Se han realizado trabajos en diferentes partes del mundo, que muestran una mayor concentración de contaminantes, específicamente metales pesados, en abejas *Apis mellifera* de apiarios instalados en sitios con mayor grado de urbanización, comparados con sitios rurales o control.

Conti y Botre (2001), estudiaron individuos de *A. mellifera* y sus productos en una zona urbana, y encontraron concentraciones de cadmio y cromo en abejas en un rango de 2.87 a 4.23 y 0.052 a 0.116 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Fakhimzadeh y Lodenius (2000), estudiaron metales en abeja, miel y polen, en una área industrial y urbana; la concentración de cadmio estuvo presente en un promedio de 0.423 $\mu\text{g g}^{-1}$. Van der Steen *et al.*, (2016), estudiaron la concentración de metales en abejas en tres zonas diferentes: rural, urbana e industrial, encontrando concentraciones promedio de 0.16 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cadmio y 0.21 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cromo; Perugini *et al.*, (2011), encontraron una concentración promedio de Cd de 0.04 $\mu\text{g g}^{-1}$, Cr de 0.74 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 0.52 $\mu\text{g g}^{-1}$ de plomo. Zaric *et al.*, (2016), encontraron concentraciones de cadmio de 0.16 $\mu\text{g g}^{-1}$, cromo 0.22 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 0.31 $\mu\text{g g}^{-1}$ para plomo; estos resultados coinciden con los encontrados en el presente trabajo, ya que las concentraciones de cadmio se encontraron en un promedio de 0.16 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Las concentraciones de cadmio encontradas en abejas en ambientes urbanizados en estudios previos, se encuentran reportadas en un rango de 0.04 a 0.4 $\mu\text{g g}^{-1}$. Los resultados encontrados en el presente trabajo se encuentran dentro del rango mencionado, ya que el cadmio se encontró en una concentración media de 0.193 $\mu\text{g g}^{-1}$ en la zona con urbanización media. En la zona con alta urbanización se encontró una concentración media de cromo de 0.178 $\mu\text{g g}^{-1}$, encontrándose dentro del rango de valores encontrado en estudios previos.

Gutiérrez *et al.*, 2015, propone un esquema de límites de referencia de acuerdo al Departamento de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Boloña (Italia), sobre las concentraciones de metales en abejas, de acuerdo al nivel de contaminación del sitio en el que se encuentran, la cual fue adaptada para ejemplificar los límites de referencia en el presente trabajo (Tabla 6).

Tabla 6. Límites de referencia de cromo y cadmio en abejas en sitios con diferentes niveles de contaminación (Tomada y modificada de Gutiérrez *et al.*, 2015).

		Aceptable	Merecedor de atención	Preocupante
Abejas	Metal	Contaminación baja	Contaminación intermedia	Contaminación alta
	Cromo	0.04 $\mu\text{g g}^{-1}$	0.05 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 0.11 $\mu\text{g g}^{-1}$	0.12 $\mu\text{g g}^{-1}$
	Cadmio	0.05 $\mu\text{g g}^{-1}$	0.06 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 0.09 $\mu\text{g g}^{-1}$	0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$

De acuerdo a estos límites, se considera como aceptable el cadmio en una concentración encontrados en la abeja de 0.04 $\mu\text{g g}^{-1}$ y preocupante en 0.12 $\mu\text{g g}^{-1}$. Si se compara con el presente estudio, las concentraciones de cadmio (0.171-0.193 $\mu\text{g g}^{-1}$), están por encima del límite de referencia preocupante.

Las concentraciones de cromo están en un rango de 0.052 a 0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ y se encuentran por encima del límite preocupante en los resultados obtenidos en el presente trabajo (0.122 y 0.178 $\mu\text{g g}^{-1}$), en las zonas con urbanización media y alta.

El cromo es un elemento producido de manera natural o por actividades antropogénicas, ampliamente distribuido en el ambiente. El cromo hexavalente, considerado xenobiótico, puede llegar a ser tóxico para algunos organismos y producir efectos letales y sub letales (Mishra *et al.*, 2010; Becerra *et al.*, 2014). Las concentraciones de cromo encontradas mayormente en sitios con alta urbanización, pueden estar relacionadas con el tipo de actividades que se desarrollan en esa zona, tales como tráfico vehicular y generación de desechos. Esto puede estar relacionado con las concentraciones de cromo encontradas en zonas con alta urbanización, ya que los contaminantes pueden adherirse al cuerpo de la abeja durante el vuelo o por ingestión de néctar y polen que utilizan como recurso.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente trabajo muestran que las abejas pertenecientes a las especies *A. mellifera* y *L. littoralis* pueden ser buenos indicadores de la presencia de cromo en la ciudad, debido a que se encontraron diferencias en los niveles de urbanización estudiados.

El cadmio y cromo se encontraron en mayor concentración en la especie *Diadasia* sp., por lo que las características biológicas propias de cada especie, podrían estar relacionadas con la adhesión de contaminantes a su cuerpo durante el vuelo.

En México existe poca información acerca de la presencia de elementos potencialmente tóxicos en polinizadores, principalmente en abejas nativas, ya que *A. mellifera* ha sido ampliamente utilizado como bioindicador en diferentes partes del mundo para conocer la presencia de elementos potencialmente tóxicos.

CAPÍTULO III

DOSIS LETAL Y FACTOR DE BIOACUMULACIÓN DE Cd, Cr Y Pb EN ADULTOS DE ABEJAS (*Apis mellifera*)

INTRODUCCIÓN

La bioacumulación es el proceso mediante el cual una sustancia química es absorbida por un organismo, aumentando su concentración con respecto al tiempo, debido a que la constante de absorción (velocidad de ingreso), a través de vías como la dérmica, gástrica o respiratoria, es mayor a la constante de eliminación o excreción. La sustancia puede ser de importancia toxicológica, debido a los efectos nocivos a la salud que se manifiestan en el organismo y estos dependen de las características físico químicas, así como la concentración, vía de ingreso del químico y la respuesta metabólica del organismo. Se puede estimar la acumulación de un químico en el organismo, por medio del factor de bioacumulación (FB), el cual contempla la concentración del químico en el organismo con respecto a la concentración en el ambiente (Arnot y Gobas, 2006); cuando estos elementos se bioacumulan en un organismo pueden ocasionar efectos letales y subletales (Di *et al.*, 2016; Van der Steen *et al.*, 2016).

Una manera común de evaluar el efecto letal de un compuesto químico sobre los organismos es a través de la cuantificación de la dosis letal media. La dosis letal media (LD₅₀) se define como la cantidad de un tóxico que ingresa al organismo y provoca la muerte del 50% de la población (Gamez y Ramírez, 2008); ésta se ha estudiado en diversos organismos a través del desarrollo de bioensayos.

Un bioensayo es la utilización de organismos vivos de manera experimental para medir el efecto de una sustancia, factor o condición, comparando con la situación antes y después del experimento. Para desarrollar un bioensayo de manera óptima, se deben estandarizar los factores que pueden influir en la respuesta, tales como: luz, temperatura, humedad relativa, dosis a suministrar, duración de la exposición y las características biológicas propias del organismo a estudiar. Este tipo de metodologías permiten conocer las características toxicológicas de ciertas sustancias que intervienen en la mortalidad o efectos, en diversos grupos de organismos, controlando variables que pueden influir en la respuesta a medir (Rodríguez *et al.*, 2009).

En este trabajo se explica el desarrollo de un bioensayo para el mantenimiento de abejas adultas *Apis mellifera* y las condiciones de alimento, luz, temperatura, humedad, así como dosis y tiempo de exposición en un tratamiento oral agudo con cloruro de cadmio (CdCl_2), cloruro de cromo (CrCl_2) y cloruro de plomo (PbCl_2). Se determinó la dosis letal media (DL_{50}) y las concentraciones de metales en las abejas sometidas a los diferentes tratamientos y se calculó el factor de bioacumulación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la Dosis Letal 50 oral (DL_{50}) y el Factor de Bioacumulación (FB) de cadmio, cromo y plomo en abejas (*Apis mellifera*), mediante curvas de toxicidad y pruebas de química analítica respectivamente, para contribuir al conocimiento de la toxicodinámica y toxicocinética de estos elementos en este organismo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un bioensayo que permita determinar la Dosis Letal 50 oral (DL_{50}) de cadmio, cromo y plomo en abejas (*Apis mellifera*), mediante curvas de toxicidad y pruebas de química analítica, para contribuir al conocimiento de la toxicodinámica de estos elementos en este organismo.
- Desarrollar un bioensayo que permita determinar el Factor de Bioacumulación (FB) de cadmio, cromo y plomo en abejas (*Apis mellifera*), mediante pruebas de espectrofotometría de masas, para contribuir al conocimiento de la toxicocinética de estos elementos en este organismo.

METODOLOGÍA

COLECTA DE MUESTRAS

Las abejas fueron colectadas directamente de la colmena del apiario perteneciente al laboratorio de interacciones biológicas del centro de investigaciones biológicas de la Universidad Autónoma del Estado

de Hidalgo; el apiario está ubicado en Tizayuca, Hidalgo, México y se encuentra libre de patógenos y alejado de cualquier fuente de contaminación que afecte la salud de la colonia.

OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES EN LABORATORIO PARA MANTENIMIENTO DE ABEJAS ADULTAS (*Apis mellifera*)

LUZ, TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA

Se introdujo un fragmento de panal operculado con cría próxima a emerger, dentro de una cámara de crecimiento marca Percival intellus environmental a 34°C y 70% de humedad relativa y en condiciones de oscuridad, con la finalidad de que emergieran adultos de *A. mellifera*. El fragmento de panal operculado fue introducido en la cámara de crecimiento a 34 °C, ya que ésta es la temperatura óptima para el desarrollo de las crías de *A. mellifera* (Di *et al.*, 2016). Los adultos de *A. mellifera* fueron aislados individualmente y se mantuvieron bajo las siguientes condiciones (Tabla 7) (OECD, 2017):

Tabla 7: Condiciones de prueba para el desarrollo de bioensayo de toxicidad aguda en abejas (*Apis mellifera*).

Factor	Condición
Temperatura	27±2°C
Fotoperiodo	12:12 h luz/oscuridad
Humedad relativa	55±3%
Edad de abejas de prueba	48 a 72 horas
Número de individuos por tratamiento	72
Número de concentraciones más control	4
Número de individuos por envase	1
Alimentación	<i>Ad libitum</i>
Agua de dilución	Agua bidestilada
Tiempo de exposición	48 horas
Respuesta letal	Mortalidad

Las abejas se colocaron en envases plásticos de 100 mL cubiertos con tela con estructura abierta en forma de red para su ventilación; dentro del envase se depositó un recipiente de 3 mL con agua bidestilada para consumo de la abeja para evitar su deshidratación (Figura 8).

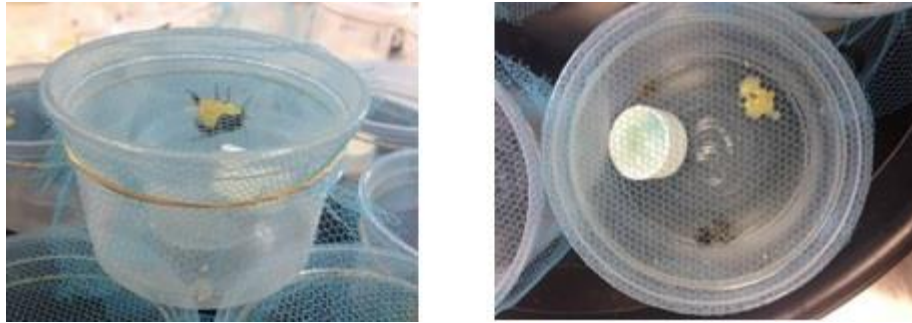


Figura 8. Recipientes para el mantenimiento de abejas separadas individualmente.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se eligieron tres metales por su importancia toxicológica (Cd, Cr y Pb). El diseño del bioensayo consistió en 4 tratamientos para cada metal, en diferentes concentraciones, con 72 individuos cada uno (N=864).

TRATAMIENTO ORAL AGUDO

Una vez separadas, las abejas se sometieron a una dieta artificial con las siguientes proporciones: 48% sacarosa (Sigma sacarosa para biología molecular $\geq 99.5\%$ pureza), 32% alimento (sustituto de polen alto en proteína Ultra Bee®), 20% solución de CdCl_2 (Merck; Cloruro de cadmio anhidro pureza 98%; Masa molar: 183,31 g/mol), CrCl_2 (Aldrich Chemistry; cloruro de cromo pureza 99.99%; masa molar 122.90 g/mol) y PbCl_2 (Aldrich Chemistry; cloruro de plomo pureza 99.99%; 278,1 g/mol), en tres concentraciones (Di, *et al.*, 2016). El agua y alimento fueron suministrados *ad libitum*, cambiando el alimento cada 12 horas durante 48 horas, en base a lo sugerido por Iannacone (2016).

Para la aplicación de concentraciones de los metales a evaluar, se asignaron cuatro grupos. El primer grupo fue el control, al cual se le suministró alimento diluido en agua bidestilada, libre de

contaminantes químicos y el segundo grupo incluyó la disolución de alimento en diferentes concentraciones de metales, de acuerdo a la metodología propuesta por Di *et al.* (2016) (Tabla 8).

Tabla 8. Tratamientos para determinar dosis letal y factor de bioacumulación en *Apis mellifera*

Control	5 $\mu\text{g g}^{-1}$ CdCl ₂	10 $\mu\text{g g}^{-1}$ CdCl ₂	15 $\mu\text{g g}^{-1}$ CdCl ₂	Número de muestras
72	72	72	72	288
Control	2 $\mu\text{g g}^{-1}$ CrCl ₂	4 $\mu\text{g g}^{-1}$ CrCl ₂	6 $\mu\text{g g}^{-1}$ CrCl ₂	
72	72	72	72	288
Control	2 $\mu\text{g g}^{-1}$ PbCl ₂	3 $\mu\text{g g}^{-1}$ PbCl ₂	5 $\mu\text{g g}^{-1}$ PbCl ₂	
72	72	72	72	288
Total de individuos				864

Se utilizó un tratamiento directo con dosis oral aguda para exponer a las abejas a los diferentes tratamientos y éstas se monitorearon cada 12 horas, reportando y separando a los individuos muertos durante cada observación. Después de 48 horas se registró el número de abejas vivas y muertas para conocer el porcentaje de mortalidad y se concluyó el experimento. Las abejas muertas se congelaron a -20°C para su preservación para posteriores análisis.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

DOSIS LETAL (DL50)

Una vez que se aplicaron los tratamientos con diferentes concentraciones de metales, se obtuvieron las abejas muertas de cada grupo, monitoreadas cada 12 horas, hasta las 48 horas; se secaron a 60° C en estufa Lab Oven durante 72 horas hasta obtener peso constante y se trituraron en mortero. Para cada uno de los análisis se homogeneizó y se pesó 0.1 g. de abejas, lo cual equivale a aproximadamente tres abejas.

FACTOR DE BIOACUMULACIÓN (FB)

Después de aplicar a las abejas los diferentes tratamientos (Tabla 8), se obtuvieron seis réplicas de abejas vivas de cada tratamiento para cada periodo de 12 horas hasta las 48 horas; se congelaron a -20 C° durante 10 minutos. Una vez muertas, las abejas se se secaron a 60° C en estufa Lab Oven durante 72 horas hasta obtener peso constante y se trituraron en mortero. Para cada uno de los análisis se homogeneizó y se pesó 0.1 g. de abejas, lo cual equivale a aproximadamente tres abejas.

DIGESTIÓN DE MUESTRAS. Se pesaron muestras de 0.1 g de abejas secas y se colocaron en vasos de polipropileno para microondas, se adicionaron 5 mL de agua desionizada, 2 mL de HNO₃ y 1 mL de H₂O₂ en cada una de las muestras (Gutiérrez *et al.*, 2015); se siguió la metodología utilizada en el capítulo I (página 17). Se realizó la curva de calibración para cada uno de los elementos de interés preparada de un estándar multi elemental (Anexo 1). La concentración de los elementos en las muestras se determinó utilizando la ecuación 1:

$$Cr = \frac{Cl}{P_m} \times V_a \times F_d$$

Dónde: **Cr**: concentración real dada en $\mu\text{g g}^{-1}$ **Cl**: concentración leída en el espectrofotómetro de plasma ($\mu\text{g g}^{-1}$); **V_{af}**: volumen de aforo expresado en L; **P_m**: peso de la muestra y **F_d**: factor de dilución.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para conocer la dosis letal, se realizó una curva dosis respuesta mediante una regresión lineal, con base en el porcentaje de mortalidad de cada una de las concentraciones de los tratamientos suministrados en abejas. Posteriormente se utilizó una prueba de ajuste de las dosis de metales (F1: concentración; F2: tiempo). De acuerdo al ajuste, se compararon los datos con un modelo ANOVA factorial bajo un modelo lineal generalizado (MLG). Por último, se obtuvo el factor de bioacumulación de los metales (FB), de acuerdo con Diener (2015), con la siguiente fórmula:

$$FB_{Metal} = \frac{\text{Concentración del metal en el organismo}}{\text{Concentración del metal suministrada}}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se suministró tratamiento oral agudo de tres metales en tres concentraciones a un total de 648 abejas (concentraciones de 5, 10 y 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ para CdCl_2 , 2, 4 y 6 $\mu\text{g g}^{-1}$ para CrCl_2 y 2, 3 y 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para PbCl_2) y se utilizaron 216 abejas para el grupo control, el cual consistió de proporcionarle a las abejas la dieta sin ningún metal. El porcentaje de abejas muertas en el desarrollo del bioensayo para el grupo control fue de 13% durante las 48 horas, lo cual sigue la recomendación propuesta por Rodríguez (2009), quienes recomiendan un porcentaje de mortalidad menor al 20% para el adecuado desarrollo de bioensayos.

Adicionalmente se realizó una prueba con un segundo grupo control al cual no se le suministró alimento (N= 72 abejas). Este segundo grupo control alcanzó un porcentaje de mortalidad de 84% durante las primeras 12 horas. Este porcentaje de mortalidad (84% en 12 horas) es mayor que el porcentaje de mortalidad a las 12 horas de cualquiera de los otros tratamientos (metales en las tres concentraciones y dieta sin metales), en los cuales se encontró un porcentaje máximo de 25% de mortalidad, lo cual indica que las abejas de los otros grupos están consumiendo el alimento. La técnica desarrollada permitió obtener un porcentaje de supervivencia de abejas del 87% en el grupo control.

CADMIO

Para el tratamiento de 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ CdCl_2 , se obtuvo la dosis letal media (DL_{50}) a las 48 horas de exposición al metal, para el de 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ CdCl_2 , a las 24 horas y para el 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ CdCl_2 , a las 24 horas. Después de 48 horas de exposición, el porcentaje de supervivencia de las abejas fue de 10, 5 y 5% para el tratamiento de 15, 10 y 5 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Estos resultados coinciden con lo reportado por Di y colaboradores (2016), quienes también encontraron una disminución en el porcentaje de supervivencia conforme aumentan las concentraciones de CdCl_2 suministradas a *A. mellifera*.

La curva dosis respuesta obtenida mediante una regresión lineal, a partir de las concentraciones de CdCl_2 con respecto al porcentaje de mortalidad después de las 48 horas de tratamiento, demuestra que conforme aumentó la concentración de CdCl_2 , el porcentaje de mortalidad fue mayor. Se encontró una dosis letal media (DL_{50}) a una concentración de 5.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ CdCl_2 (Figura 9).

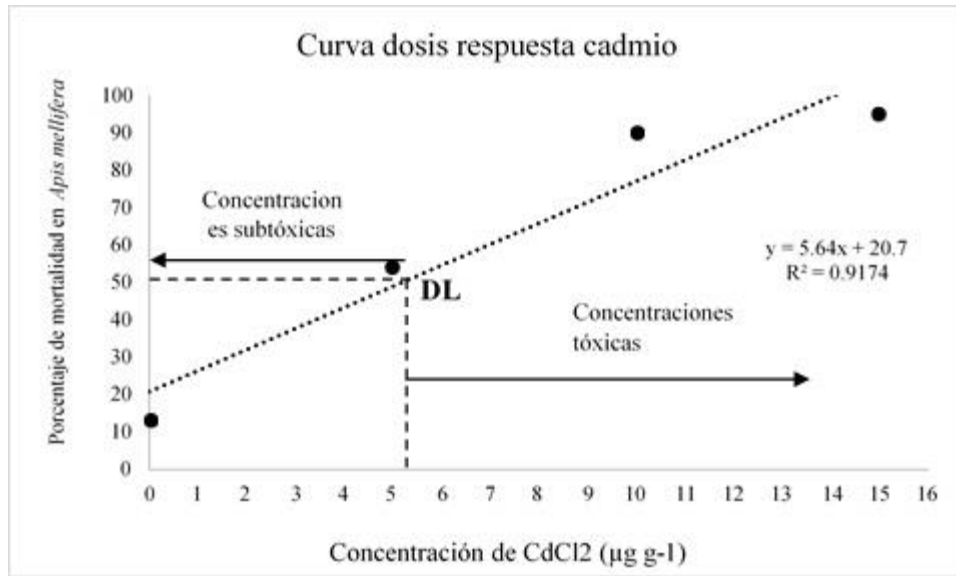


Figura 9. Regresión lineal dosis respuesta de cadmio (CdCl_2) en abejas *Apis mellifera*. DL50: dosis letal 50.

Los análisis de la concentración de cadmio en abejas sometidas al bioensayo mostraron una mayor cantidad de cadmio en las abejas sometidas al tratamiento con mayor concentración de CdCl_2 ($15 \mu\text{g g}^{-1}$ CdCl_2) en los análisis espectroscópicos, lo cual sugiere que las abejas se alimentaron durante el tratamiento y que están acumulando el metal.

Al realizar el análisis del modelo lineal generalizado (MLG) se encontró un efecto significativo de la concentración de cadmio ($F_{(2,60)}=13.83$; $p<0.0001$) y el tiempo de exposición de la abeja ($F_{(3,60)}=3.01$; $p=0.037$), pero no de la interacción entre concentración y tiempo ($F_{(6, 60)} = 0.57$, $p = 0.75$), lo cual sugiere independencia entre variables. La comparación a posteriori con la prueba de Tukey, mostró que la concentración más elevada de cadmio ($15 \mu\text{g g}^{-1}$) tiene un efecto significativamente mayor ($p< 0.05$) sobre la acumulación de cadmio que la menor concentración ($5 \mu\text{g g}^{-1}$), pero no existen diferencias significativas entre la acumulación de cromo en las concentraciones media ($10 \mu\text{g g}^{-1}$) y alta y entre la concentración baja y media ($p> 0.05$) (Figura 10). La respuesta de tiempo, mostró un aumento significativo al comparar la exposición de las abejas a 48 horas con respecto a la exposición durante 12 horas ($p< 0.05$), pero no hubo diferencias significativas entre los demás tiempos de exposición ($p> 0.05$) (Figura 10).

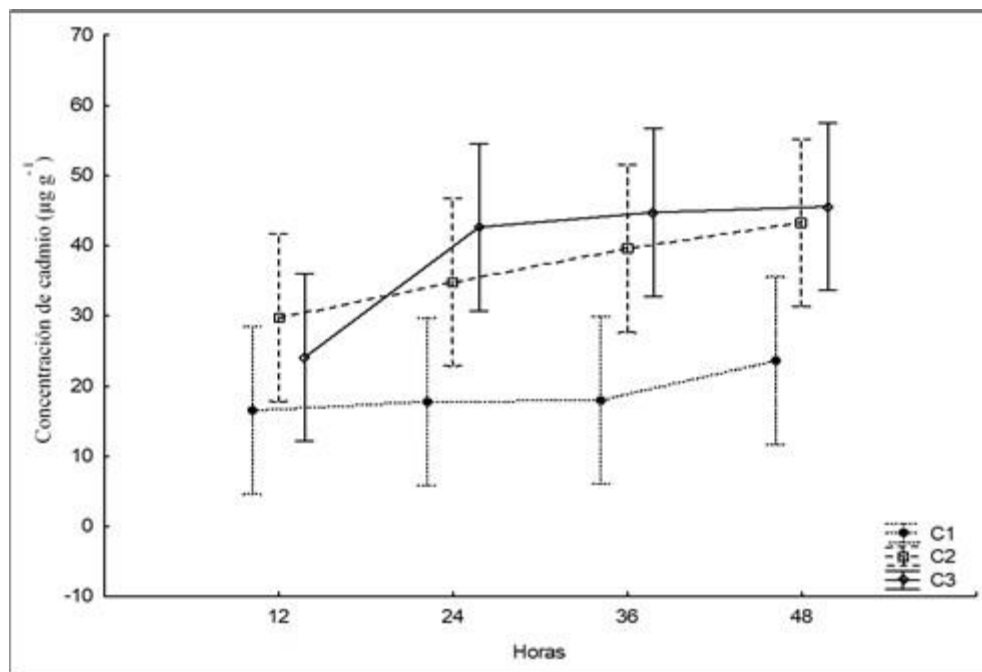


Figura 10. Respuesta dosis y tiempo de la acumulación de cadmio. C1= 5 µg g⁻¹ CdCl₂, C2=10 µg g⁻¹ CdCl₂, C3=15 µg g⁻¹ CdCl₂. Concentraciones promedio ± error estándar.

Por último, se encontró que el factor de bioacumulación en las abejas aumentó con el tiempo en las tres concentraciones suministradas (Tabla 9).

Tabla 9. Factor de bioacumulación de cadmio en abejas (*Apis mellifera*).

Hora	5 µg g ⁻¹	10 µg g ⁻¹	15 µg g ⁻¹
12	3.30	2.98	1.61
24	3.56	3.48	2.84
36	3.59	3.96	2.98
48	4.72	4.33	3.04

Se define como factor de bioacumulación, a la relación de la concentración encontrada en el organismo con respecto a la encontrada en el medio en el que se desarrolla, considerando la biodisponibilidad del químico, así como las características fisicoquímicas del entorno y las biológicas del

organismo (Diener *et al.*, 2015). Cuando el factor de bioacumulación es igual o mayor a 1, se considera que el organismo está acumulando cierta sustancia (Covarrubias *et al.*, 2017).

Se encontró un mayor factor de bioacumulación en el grupo sometido a la menor concentración suministrada (Tabla 9). Este resultado puede deberse a que, después de un tiempo, la abeja disminuyó el consumo de alimento con los tratamientos con mayor concentración de cadmio y, por lo tanto, acumuló menor cantidad del elemento. Ayestaran *et al.*, (2010), sugieren que *Apis mellifera* presenta aversión y un malestar post consumo, al detectar ciertos componentes tóxicos en el alimento.

Van der Fels *et al.*, (2016), calcularon el factor de bioacumulación en dos especies de insectos que alimentaron con cadmio en concentraciones menores a las utilizadas en este trabajo y encontraron que éste era de 6.1 a 9.5 para adultos de la mosca *Hermetia illucens*, lo cual es mayor que los resultados encontrados en el presente trabajo y entre 0.43 y 0.71 en larvas del escarabajo *Tenebrio molitor*, lo cual es menor a lo encontrado en este trabajo, para abejas. Diener *et al.*, (2015) calcularon el factor de bioacumulación de cadmio utilizando dietas con cadmio en concentraciones similares a las utilizadas en este trabajo y encontraron un rango de factor de bioacumulación entre 2.32 y 2.94 en adultos de la mosca *Hermetia illucens*, el cual es similar al aquí reportado.

CROMO

Para el tratamiento de $2 \mu\text{g g}^{-1} \text{CrCl}_2$, se obtuvo la dosis letal media (DL_{50}) a las 48 horas de exposición al metal y para las de 4 y $6 \mu\text{g g}^{-1} \text{CrCl}_2$ a las 36 horas. Después de 48 horas de exposición, el porcentaje de supervivencia de las abejas fue de 38, 28 y 25% para el tratamiento de 2 , 4 y $6 \mu\text{g g}^{-1} \text{CrCl}_2$, respectivamente. La curva dosis respuesta obtenida mediante una regresión lineal, a partir de las concentraciones de CrCl_2 con respecto al porcentaje de mortalidad después de las 48 de tratamiento, demuestra que conforme aumentó la concentración de CrCl_2 , el porcentaje de mortalidad fue mayor. Se encontró una dosis letal media (DL_{50}) a una concentración de $2.4 \mu\text{g g}^{-1} \text{CrCl}_2$ (Figura 11).

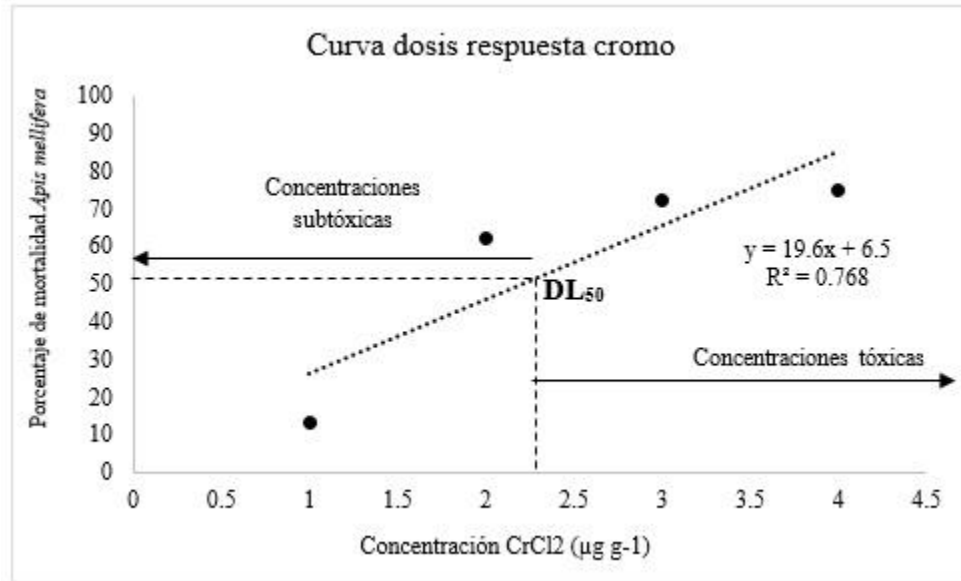


Figura 11. Regresión lineal dosis respuesta de cromo en abejas *Apis mellifera*. DL₅₀: dosis letal 50.

Los análisis de la concentración de cromo en las abejas sometidas al tratamiento con mayor concentración de CrCl₂ ($6 \mu\text{g g}^{-1}$ CrCl₂) fueron las que mostraron mayor cantidad de cromo en los análisis espectroscópicos, lo cual sugiere que las abejas se alimentaron durante el tratamiento y que están acumulando el metal.

Al realizar el análisis del modelo lineal generalizado (MLG) se encontró un efecto significativo del tiempo de exposición ($F_{(3,60)}=37.85$; $p<0.0001$), de la concentración de cromo ($F_{(2,60)}=12.10$; $p<0.0001$) y de la interacción entre los dos factores ($F_{(6,60)}=5.48$; $p=0.0001$), por lo que se distingue un efecto dosis respuesta (Figura 12). La respuesta de tiempo, mostró un aumento significativo al comparar la exposición de las abejas a las 48 horas con respecto a los demás tiempos de exposición ($p< 0.05$), pero no hubo diferencias significativas entre los otros tiempos de exposición ($p> 0.05$) (Figura 12).

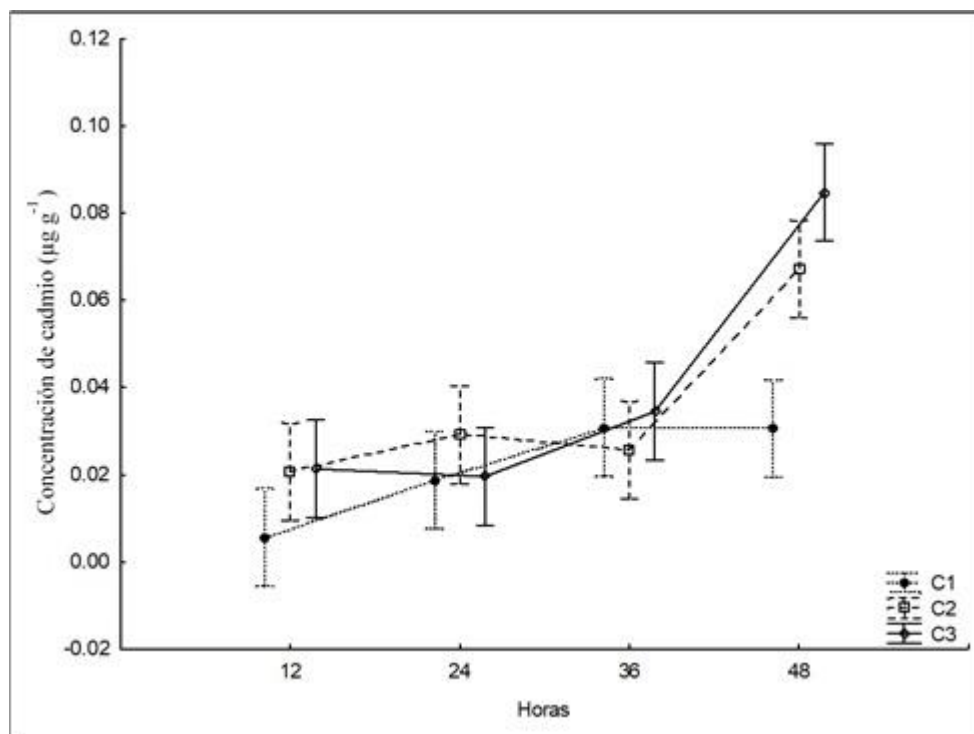


Figura 12. Respuesta dosis y tiempo de la acumulación de cromo. C1=2 µg g⁻¹ CrCl₂, C2=4 µg g⁻¹ CrCl₂, C3=6 µg g⁻¹ CrCl₂. Concentraciones promedio ± error estándar.

Por último, se encontró que el factor de bioacumulación en las abejas aumentó con el tiempo de exposición en las tres concentraciones suministradas (Tabla 10).

Tabla 10. Factor de bioacumulación de cromo en abejas (*Apis mellifera*).

Hora	2 µg g ⁻¹	4 µg g ⁻¹	6 µg g ⁻¹
12	0.001	0.008	0.006
24	0.015	0.012	0.005
36	0.024	0.010	0.009
48	0.024	0.027	0.022

PLOMO

Para el tratamiento de 2 y 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ PbCl_2 , se obtuvo la dosis letal media (DL_{50}) a las 36 horas de exposición al metal. Para el tratamiento de 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ PbCl_2 , se obtuvo la DL_{50} a las 48 horas de exposición al metal. Después de 48 horas de exposición, el porcentaje de supervivencia de las abejas fue de 61, 56 y 46% para el tratamiento de 2, 3 y 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ PbCl_2 , respectivamente.

Las concentraciones de plomo en abejas de todos los tratamientos, se encontraron por debajo de los límites de detección del equipo, esto puede deberse a que, a diferencia de los otros metales estudiados, el plomo podría ser eliminado por las abejas.

CONCLUSIÓN

El presente estudio aporta información acerca de la dosis letal de cadmio, cromo y plomo en adultos de *Apis mellifera*. Las diferencias en las dosis suministradas son más importantes que el tiempo para explicar la acumulación del cadmio y afecta de manera independiente la acumulación en las abejas. Las diferencias en el tiempo de exposición al cromo, son más importantes en la acumulación y muestran un efecto dosis respuesta.

Es necesario seguir realizando estudios acerca de la respuesta de las abejas a la presencia de elementos potencialmente tóxicos en el ambiente, así como el desarrollo de bioensayos para conocer los efectos de la interacción (sinergismo, antagonismo), de diferentes metales.

La metodología utilizada con las variables controladas permitió tener éxito en el porcentaje de supervivencia de las abejas del grupo control con alimento, ya que el porcentaje de mortalidad en los tres tratamientos (CdCl_2 , CrCl_2 y PbCl_2) fue menor al 20%, límite sugerido para el desarrollo de bioensayos.

En el desarrollo del bioensayo, el grupo control sin alimento demuestra que las abejas sometidas al tratamiento de CdCl_2 , CrCl_2 y PbCl_2 , están alimentándose, ya que se observa un mayor porcentaje de mortalidad con respecto a los grupos sometidos al tratamiento.

Los resultados presentados forman parte de un aporte a la documentación base para regular los límites permisibles de los elementos estudiados en los productos de abeja consumidos por el hombre en México. Los resultados de este trabajo podrían contribuir al establecimiento de los límites permisibles de cadmio y cromo en abejas y sus productos, ya que actualmente, en el país no existen regulaciones al respecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou-Shaara, H.F. y Staron, M. (2019). Present and future perspectives of using biological control agents against pests of honey bees. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(24):1-7.
- Al Naggar, Y.A., Naiem, E.S.A., Seif, A.I. y Mona, M.H. (2013). Honey bees and their products as bioindicator of environmental pollution with heavy metals. *Mellifera*, 13(26):10-20.
- Al Waili, N.S., Salom, K., Butler, G. y Al Ghamdi, A.A. (2012). Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. *Journal of Medicinal Food*, 14(10):1079–1096.
- Andrews, E. (2019). To save or not save the bees: honey bee health in the Anthropocene. *Agriculture and Human Values*, doi: 10.1007/s10460-019-09946-x
- Arnot, J.A. y Gobas, F.A.P.C. (2006). A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessment for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, 14: 257-297.
- Ashworth, L., Quesada, M., Casas, A., Aguilar, R. y Oyama, K. (2009). Pollinator dependent food production in Mexico. *Biological Conservation*, 142: 1050-1057.
- ATSDR. (2012). Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades: Cromo.
- Ayesteran, A., Guirfa, M. y Brito Sanchez, M. G. (2010). Toxic but drank: Gustatory aversive compounds induce post-ingestional malaise in harnessed honeybees. *PLoS ONE*, 5.
- Badawy, M.E.I., Nasr, H.M. y Rabea, E.I. (2014). Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. *Apidologie*, doi: 10.1007/s13592-014-0315-0.
- Barganska, Z., Slebioda, M. y Namiesnik, J. (2015). Honey bees and their products bioindicators of environmental contamination. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(3):235–248.

Becerra, T.S., Soria, F.C., Jaramillo, J.F., y Moreno, H.J. (2014). Trastornos a la salud inducidos por cromo y el uso de antioxidantes en su prevención o tratamiento. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 2(2):19-30.

Benéteau, B.A; Benneveau, A; G eret, F; Delatte, H; Becker, N; Brunet, J.L; Reynaud, B. y Belzunces, L.P. (2013). Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. *Environment International*, 60: 31-41.

Berry, J.A., Hood, W.M., Pietravalle, S. y Delaplane, K.S. (2013). Field level sublethal effects of approved bee hive chemicals on honey bees (*Apis mellifera* L). *PLOS ONE*, doi: 8(10):e76536.

Bibi, S., Zahoor, H.S. y Naseem, M.R. (2008). Pollen analysis and heavy metals detection in honey samples from seven selected countries. *Pakistan Journal of Botany*, 40(2):507-516.

Bilandzic, N., Dokic, M., Sedak, M., Kolanovic, B.S., Varenina, I., Koncurat, A. y Rudan, N. (2011). Determination of trace elements in Croatian floral honey originating from different regions. *Food Chemistry Journal*, 128: 1160-1164.

Black, J. (2006). Honeybee nutrition: review of research and practices. *Rural Industries Research and Development Corporation*. 79 pp.

Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37: 1-18.

Boyd, R. (2010). Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 46-58.

Bratu, I. y Beorgescu, C. (2005). Chemical contamination of bee honey identifying sensor of the environment pollution. *Journal of Central European Agriculture*, 6: 95–98.

Burden, C.M., Morgan, M.O., Hladun, K.R., Amdam, G.V., Trumble, J.J. y Smith, B.H. (2018). Acute sublethal exposure to toxic heavy metals alters honey bee (*Apis mellifera*) feeding behavior. *Scientific Reports*, 9(4253):1-10.

Butt, A., Ain, Q., Rehman, K., Khan, M.X. y Hesselberg, T. (2018). Bioaccumulation of cadmium, lead, and zinc in agricultura based insect food chains. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(698):1-12 doi: 10.1007/s10661-018-7051-2

Caruso, T., Migliorini, M., Bucci, C. y Brgagli, R. (2009). Spatial patterns and autocorrelation in the response of microarthropods to soil pollutants: the example of oribatid mites in an abandoned mining and smelting area. *Environmental Pollution*, 157: 2939-2948.

Charlesworth, S., de Miguel, E. y Ordoñez, A. (2010). A review of the distribution of particulate trace elements in urban terrestrial environments and its application to considerations of risk. *Environmental Geochemistry and Health*, 33: 103-123.

Chabukdhara, M. y Nema, A. K. (2013). Heavy metals assessment in urban soil around industrial clusters in Ghaziabad, India: Probabilistic health risk approach. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 87: 57-64.

Collet, C y Belzunces, L. (2007). Excitable properties of adult skeletal muscle fibres from the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, 210(3):454-64.

Conti, M. E. y Botre, F. (2001). Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, 69(3): 267-282.

Covarrubias, S. y Peña, J. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33: 7-21.

Cozmuta, M.A., Bretan, L., Cozmuta, M.L., Nicula, C. y Peter, A. (2012). Lead traceability along soil melliferous flora bee family apiary products chain. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(6):1622-1630.

Creamer, R.E., Rimmer, D.L. y Black, H.I.J. (2008). Do elevated soil concentrations of metals affect the diversity and activity of soil invertebrates in the long term? *Soil Use and Management*, 24: 37-46.

Cutler, C., Purdy, J., Giesy, J. y Solomon, K. (2014). Risk to pollinators from the use of chlopyrifos in North America. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 231: 219-265.

Davodpour, R., Sobhanardakani, S., Cheraghi, M., Abdi, N. y Lorestani, B. (2019). Honeybees (*Apis mellifera* L.) as a potential bioindicator for detection of toxic and essential elements in the

environment (Case study: Markazi Province, Iran). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 77(3):344-358.

Desoky, A.E.A.S., Omran, N.S., Omar, M.O.M., Hussein, M.H., y Abd-Allah, M.M. (2019). Heavy metals concentrations in bee products collected from contaminated and non contaminated areas from Upper Egypt Governorates. *Journal of Advances in Agriculture*, 10: 1657-1666.

Di, N., Hladun, K.R., Zhang, K., Liu, T.X. y Trumble, J.T. (2016). Laboratory bioassays on the impact of cadmium, copper and lead on the development and survival of the honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae and foragers. *Chemosphere*, 152: 530-538.

Díaz, S., Paz, S., Rubio, C., Gutiérrez, A.J., González, D., Revert, C., Bentabo, A. y Hardisso, A. (2019) Toxic metals and trace elements in artisanal honeys from the Canary Islands. *Biological Trace Element Research*, 190(1):242–250.

Diener, S., Zurbrugg, C. y Tockner, K. (2015). Bioaccumulation of heavy metals in the black soldier fly, *Hermetia illucens* and effects on its life cycle. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(4):261–70.

Dzugan, M., Wesolowska, M., Zagula, G., Kaczmarzski, M., Czernicka, M. y Puchalski, C. (2018). Honeybees (*Apis mellifera*) as a biological barrier for contamination of honey by environmental toxic metals. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(101):1-9. doi: 10.1007/s10661-018-6474-0

Erbilir, F. y Erdogru, O. (2005). Determination of heavy metals in honey in Kahramanmaras city, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 109(1-3):181-187.

Eskova, M.D. (2012). Dynamics of lead and cadmium in bodies of bee consuming food polluted by these elements. *Russian Agricultural Sciences*, 38(4):337-339.

Fakhimzadeh, K. y Lodenius, M. (2000). Heavy metals in finish honey, pollen and honey bees. *Apiacta*, 35(2): 85-95.

Finger, D., Filho, I.K., Torres, Y.R. y Quinafia, S.P. (2014). Propolis as an indicator of environmental contamination by metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92: 259-264.

Formicki, G., Gren, A., Stawarz, R., Zysk, B. y Gal, A. (2013). Using honey bee as bioindicator of chemicals in Campanian agroecosystems (South Italy). *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(1):99-106.

Fortel, L., Henry, M., Guilbaud, L., Guirao, A.L., Kuhlmann, M. y Mouret, H. (2014). Decreasing abundance, increasing diversity and changing structure of the wild bee community (Hymenoptera: Anthophila) along an urbanization gradient. *PLoS ONE* 9(8):e104679. doi:10.1371/journal.pone.0104679.

Frausto, C.R., Casillas, R.P., Quintanar, S.J.L., Macias, L.E., Bujdud, P.J.M. y Medina, I.R. (2017). Spectroscopic study of honey from different regions in Mexico. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 178: 212-217.

Fredes, C. y Montenegro, G. (2006). Heavy metals and other trace elements contents in Chilean honey. *Ciencia e Investigación Agraria*, 33(1): 50-58.

Gamez, R.C.M. y Ramírez, R.E.J. (2008). Tesis: Determinación de la concentración letal media (CL50) del herbicida Roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. Universidad de La Salle, Bogotá, D.C. 208 pp.

García, A.I.V, Encarnación, M.J.L. y Hernando, M.D. (2016). Determination of select environmental contaminants in foraging honeybees. *Talanta*, 148: 1-6.

Gardiner, M.M. y Harwood, D.J. (2017). Influence of heavy metal contamination on urban natural enemies and biological control. *Current Opinion in Insect Science*, 20: 45-53.

Gauthier, M., Aras, P., Jumarie, C. y Boily, M. (2016). Low dietary levels of Al, Pb and Cd may affect the non enzymatic antioxidant capacity in caged honey bees (*Apis mellefera*). *Chemosphere*, 144: 848-854.

Gergoks, V. y Hufnagel, L. (2009). Application of oribatid mites as indicators. *Applied Ecology and Environmental Research*, 7(1):79-98.

Giglio, A., Ammendola, A., Battistella, S., Naccarato, A., Pallavicini, A., Simeon, E., Tagarelli, A. y Giulianini, P.G. (2017). *Apis mellifera lingustica*, Spinola 1806 as bioindicator for detecting environmental contamination: a preliminary study of heavy metal pollution in Trieste, Italy. *Environmental Science Pollution Research*, 24: 659-665.

Gizaw, G., Kim, Y., Moon, K., Choi, J., Kim, Y. y Kyun, P. (2020). Efecto de metales pesados ambientales en la expresión de genes relacionados con la desintoxicación en la abeja *Apis mellifera*. *Apidología*, doi: 10.1007/s13592-020-00751-8

Goretti, E., Pallottini, M., Rossi, R., La Porta, G., Gardi, T., Goga, B. C. y Selvaggi, R. (2019). Heavy metal bioaccumulation in honey bee matrix, an indicator to assess the contamination level in terrestrial environments. *Environmental Pollution*, doi: 10.1016/j.envpol.2019.113388.

Gunnar, N. (2012). Metales: propiedades químicas y toxicidad. En: enciclopedia de la OIT. España: D-INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo).

Gutiérrez M., Molero, R., Gaju, M., Steen, J., Porrini, C. y Ruiz, J.A. (2015). Assessment of heavy metal pollution in Córdoba (Spain) by biomonitoring foraging honeybee. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 1–15.

Hladun, K. R., O. Kaftanoglu, D. R. Parker, K. D. Tran y Trumble, J. (2013). Effects of selenium on development, survival and accumulation in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(11): 2584-2592.

Hobbelen, P. H. F., van den Brink, P.J., Hobbelen J.F. y van Gestel, C.A.M. (2006). Effects of heavy metals on the structure and functioning of detritivore communities in a contaminated floodplain area. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7):1596-1607.

Iannacone, O.J.A. (2016). Impacto de los plaguicidas en la abeja melifera. Artículos académicos y de Investigación, Universidad Ricardo Palma. URI: <http://repositorio.urp.edu.pe/handle/urp/695>.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). (2017). Principales resultados del censo de población y vivienda 2017.

Islam, S., Ahmed, K., Habibullah-Al-Mamun, M. y Masunaga, S. (2014). Potential ecological risk of hazardous elements in different land use urban soils of Bangladesh. *Science of the Total Environment*, 512-513: 94-102.

Jacob, D.L., Yellick, A.H., Kissoon, L.T., Asgary, A., Wijeyaratne, D.N., Bernhardt, S.E. y Otte, M.L. (2013). Cadmium and associated metals in soils and sediments of wetlands across the Northern Plains, USA. *Environmental Pollution*, 178: 211-219.

Johnson, R.M., Ellis, M. y Mullin, C. (2010). Pesticides and honey bee toxicity. *Apidologie*, 41(3):312-331.

Johnson, R.M. (2015). Honey bee toxicology. *Annual Review of Entomology*, 60: 415-434.

Jumarie, C., Aras, P. y Boily, M. (2017). Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. *Chemosphere*, 168:163–70

Kabir, E., Ray, S., Kim, K.H., Yoon, H.O., Jeon, E.C., Kim, Y.S., Cho, Y.S., Yun, S.T. y Brown, R.J.C. (2012). Current status of trace metal pollution in soils affected by industrial activities. *The Scientific World Journal*, 1–19.

Kalbande, D. M., Dhadse, S.N., Chaudhari, P. R. y Wate, S.R. (2008). Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 138(1-3):233-238.

Khalil, M. A., Janssens, T.K.S., Berg, M.P. y Van Straalen, N.M. (2009). Identification of metal responsive oribatid mites in a comparative survey of polluted soils. *Pedobiología*, 52, 207-221.

Lambert, O., Veyrand, B., Durand, S., Marchand, P., Le Bizec, B., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, S., Delbac, F., y Pouliquen, H. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons: bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere*, 86(1):98-104.

Li, F.; Fan, Z.; Xiao, P.; Oh, K.; Ma, X. y Hou, W. (2009). Contamination, chemical speciation and vertical distribution of heavy metals in soils of an old and large industrial zone in Northeast China. *Environmental Geology*, 57: 1815–1823.

Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J. y Robert, D. (2013). Chapter 5: Bioindicators of toxic metals, 151-228.

López, A. S., Martí, A., Subovsky, M. y Castillo, A. (2016). Métodos de recolección de propóleos: su incidencia en rendimiento y calidad. *Agrotecnia*, 10: 10-14.

Madueño, P.R. (2000). La Huasteca hidalguense: pobreza y marginación social acumulada. *Sociológica*, 15(44): 97-131.

Maryanski, M., Kramarz, P., Laskowski, R. y Niklinska, M. (2002). Decreased energetic reserves, morphological changes and accumulation of metals in carabid beetles (*Poecilus cupreus* L.). *Ecotoxicology*, 11: 127-139.

Matin, G., Kargar, N. y Buyukisik, H.B. (2016). Biomonitoring of cadmium, lead, arsenic and mercury in industrial districts of Izmir, Turkey by using honey bees, propolis and pine tree leaves. *Ecological Engineering*, 90: 331-335.

McDonell, M.J. y Hahs, A.K. (2015). Adaptation and adaptedness of organisms to urban environments. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 46: 261-280.

McGeoch, M.A. (2007). Insects and bioindication: theory and progress. In: Stewart AJA, New TR, Lewis OT (eds) Insect conservation biology. *Royal Entomological Society, CABI, UK*.144-174.

Meindl, G. A. y Ashman, T.L. (2013). The effects of aluminum and nickel in nectar on the foraging behavior of bumblebees. *Environmental Pollution*, 177: 78-81.

Michener, C.D. (2007). The bees of the world. 2^a ed. The Johns Hopkins University Press, 953 pp.

Migdalek, G., Wozniak, M., Slomka, A., Godzik, B., Jedrzejczyk-Korycinska, M., Rostanski, A., Bothe, H. y Kuta, E. (2013). Morphological differences between violets growing at heavy metal polluted and no polluted sites. *Flora Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 208: 87-96.

Mishra, V., Samantaray, D.P., Dash, S.K., Mishra, B.B. y Swain, R.K. (2010). Study on hexavalent chromium reduction by chromium resistant bacterial isolates on Sukinda mining area. *Our Nature*, 8: 63-71.

Mogren, C. L., y Trumble, J. T. (2010). The impacts of metals and metalloids on insect behavior. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 135(1):1-17.

Moron, D., Grzes, I.M., Skorka, P., Szentgyorgyi, H., Laskowski, R., Potts, S.G. y Woyciechowski, M. (2012). Abundance and diversity of wild bees along gradients of heavy metal pollution. *Journal of Applied Ecology*, 49(1): 118-125.

Murphy, L.U., Cochrane, T.A. y O'Sullivan, A. (2015). The influence of different pavement surfaces on atmospheric copper, lead, zinc, and suspended solids attenuation and wash off. *Water, Air and Soil Pollution*, 226-232.

Nagajyoti, P.C., Lee, K.D. y Sreekanth, T.V.M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8: 199-216.

Negri, I, Mavris, C., Di Prisco, G., Caprio, E., y Pellecchia, M. (2015). Honey bees (*Apis mellifera*, L.) as active samplers of airborne particulate matter. *PLoS ONE*, 10(7) doi: 10.1371/journal.pone.0132491

Nowak, L., Dziezyc, H. y Piotrowski, M. (2011). Content of bioelements and toxic metals in honey of various botanical origin from lower Silesia. *Journal of Elementology*, 437-444.

OECD. (2017) Guideline for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity: Acute Toxic Class Method.

Ozcan, M.M. y Al Juhaimi, F.Y. (2012). Determination of heavy metals in bee honey with connected and not connected metal wires using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(4):2373-2375.

Padilla, A.F., Padilla, F., Cuesta, A. y Cuesta, L.A.E. (2003). Zoología aplicada. Capítulo 13: Clase Insectos: Anatomía y fisiología de la abeja doméstica (*Apis mellifera* L.). Organización social. Apicultura. Producción y manejo. México. Ed. Díaz de Santos. 488 pp.

Panseri, S., Catalano, A., Giorgi, A., Arioli, F., Procopio, A., Britti, D. y Chiesa, L.M. (2014). Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. *Food Control*, 38: 150-156.

Paš, M., Mila, R., Drašlar, K., Pollak, N. y Raspor, P. (2004). Uptake of chromium (III) and chromium (VI) compounds in the yeast cell structure. *BioMetals*, 17: 25-33.

Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., Sofò, A. y Gambacorta, E. (2012). Metal content of southern Italy honey of different botanical origins and its correlation with polyphenol content and antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 47: 1909-191

Perugini, M., Manera, M., Grotta, L., Abete, M., Tarasco, R. y Amorena, M. (2011). Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. *Biological Trace Element Research*, 140(2):170-176.

Ping, Z., Huiling, Z. y Wensheng, S. (2009). Biotransfer of heavy metals along a soil plant insect chicken food chain: Fieldstudy. *Journal of Environmental Science*, 21: 849-853.

Porrini, C., Caprio, E., Tesoriero, D. y Di Prisco, G. (2014). Using honey bee as bioindicator of chemicals in Campanian agroecosystems (South Italy). *Bulletin of Insectology*, 67(1):137-146.

PROY-NOM-004-SAG/GAN-2017. SAGARPA HIDALGO, 2017.

Ramírez, A. (2002). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 63(1):51-64.

Roman, A. (2010). Levels of cooper, selenium, lead and cadmium in forager bee. *Polish Journal of Environmental Study*, 19(3):663-669.

Roman, A., Madras, M.B. y Popiela, P.E. (2011). Comparative study of selected toxic elements in propolis and honey. *Journal of Apicultural Science*, 55(2):97-106.

Rodríguez, M.J., Silva, A.G. y Guzmán, P. (2009). El bioensayo con plaguicidas en Artrópodos. En: Tópicos selectos de estadística aplicados a la fitosanidad. Primera Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillo. Texcoco. México. 129-158.

Rodríguez, D.L., Ahumada, D.A., Díaz, A.C. y Guerrero, J.A. (2014). Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. *Food Control*, 37: 33-40.

Ruschioni, S., Riolo, P., Minuz, R.L., Stefano, M., Canella, M., Porrini, C. e Isidro, N. (2013). Biomonitoring with honeybees of heavy metals and pesticides in nature reserves of the Marche region (Italy). *Biological Trace Element Research*, 154: 226-233.

Sadeghi, A., Mozafari, A., Bahmani, R. y Shokri, K. (2012). Use of honeybees as bio indicators of environmental pollution in the Kurdistan Province of Iran. *Journal of Apicultural Science*, 56(2):83-88.

SAGARPA, HIDALGO. (2017).

Sánchez, E.K. (2017). Tesis: Respuesta de *Apis mellifera* y *Opuntia heliabravoana* Scheinvar a la urbanización en la ciudad de Pachuca, Hidalgo, México. UAEH, 95 pp.

Santamaría, J. M., Moraza, M.L., Elustondo, D., Baquero, E., Jordana, R., Lasheras, E., Bermejo, R. y Ariño, A.H. (2012). Diversity of Acari and Collembola along pollution gradient in soils of a prepyrenean forest ecosystem. *Environmental Engineering and Management Journal*, 11(6):1159-1169.

Santorufu, L., van Gestel, C.A., Rocco, A. y Maisto, G. (2012). Soil invertebrates as bioindicators of urban soil quality. *Environmental Pollution*, 161: 57-63.

Sekhar, K. C., Chary, N.S, Kamala, C.T. y Anjaneyulu, Y. (2004). Utilization of plant metal interactions for environmental management: from a general disbelief to Universal Acceptance. *Proceeding of the Indian National Science Academy*, 70(1):13-30.

Seniczak, A., Ligocka, A., Seniczak, S. y Paluszak, Z. (2009). The influence of cadmium on life history parameters and gut microflora of *Archezogetes longisetosus* (Acari: Oribatida) under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 47(3):191-200.

Seregin, I. V. y Kozhevnikova, A.D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2):257-277.

Silici, S., Uluozlu, O.D., Tuzen, M. y Soylak, M. (2013). Honey bee and honey as monitors for heavy metal contamination near the thermal power plants in Mugla, Turkey. *Toxicology and industrial health*, 1-10. Doi: 0.1177/0748233713503393.

Taha, E.A., Manosur, H.M. y Shower, M.B. (2010). The relationship between comb age and the amounts of mineral elements in honey and wax. *Journal of Apicultural Research*, 49: 202-207.

Tiwari, P., Naithani, P. y Tiwari, J.K. (2016). Determination of heavy metals in honey samples from submontane and montane zones of Garhwal Himalaya India. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(7):812-819.

Torres, R.A., Wallace, R. y Ayala, R. (2013). Present and potential use of bees as managed pollinators in Mexico, Southwestern. *Entomologist*, 38(1):133-148.

Toth, T., Kopernicka, M., Sabo, R. y Kopernicka, T. (2016). The evaluation of mercury in honey bees and their products from Eastern Slovakia. *Animal Science and Biotechnologies*, 49(1):257-260.

Tran, T. A. y Popova, L.P. (2013). Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany*, 37(1):1-13.

Van der Fels, K.H.J., Camenzuli, L., Van der Lee, M.K. y Oonincx, D.G.A.B. (2016). Uptake of cadmium, lead and arsenic by *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* from contaminated substrates. *PLoS ONE*, 11(11): e0166186. doi:10.1371/journal.pone.0166186.

Van der Steen, J.J.M., Cornelissen, B., Blacquiere, T., Pijnenburg, J.E.M.L. y Severijnen, M. (2016). Think regionally, act locally: metals in honeybee workers in the Netherlands (surveillance study 2008). *Environmental Monitoring and Assessment*, 188: 463-471.

Wahl, J.J., Theron, P.D. y Maboeta, M.S. (2012). Soil mesofauna as bioindicators to assess environmental disturbance at a platinum mine in South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86: 250-260.

Xia, F.; Qu, L.; Wang, T.; Luo, L.; Chen, H.; Dahlgren, R.A.; Zhang, M.; Mei, K. y Huang, H. (2018). Distribution and source analysis of heavy metal pollutants in sediments of a rapid developing urban river system. *Chemosphere*, 207: 218–228.

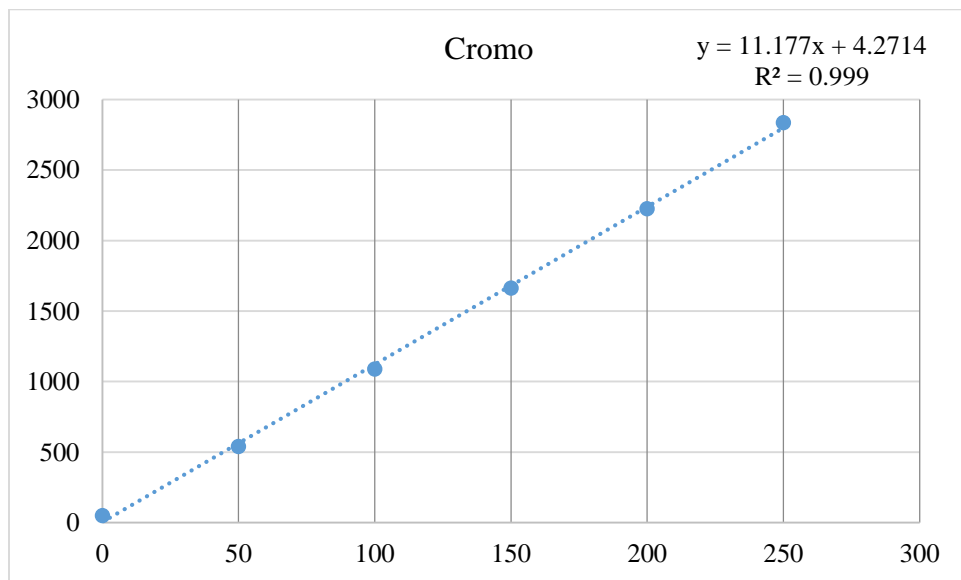
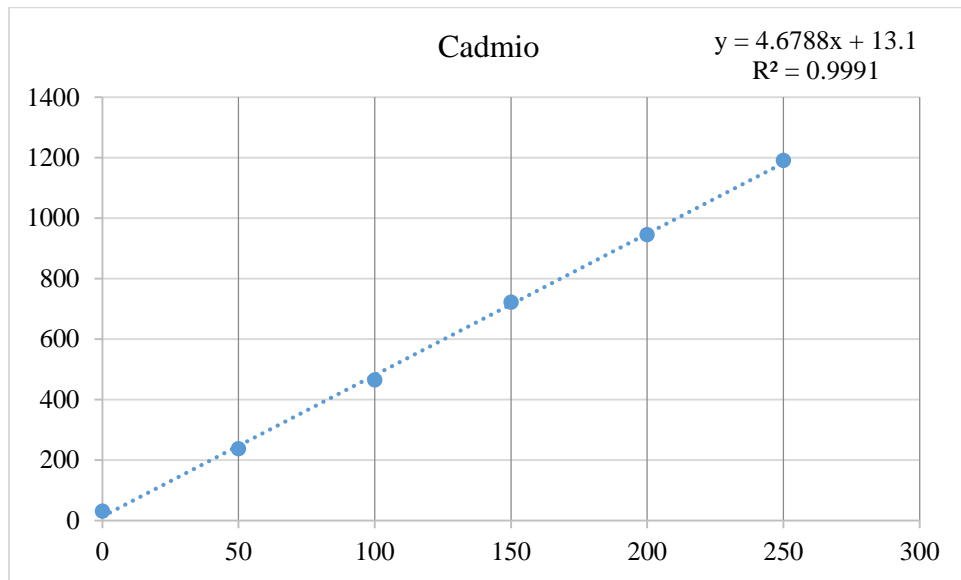
Xiao, F., Chen, D., Luo, L., Zhong, X., Xie, Y., Zou L., Zeng, M., Guan, L. y Zhon, C. (2013). Time order effects of vitamin C on hexavalent chromium induced mitochondrial damage and DNA protein crosslinks in cultured rat peripheral blood lymphocytes. *Molecular Medicine Reports*, 8(1):53-60.

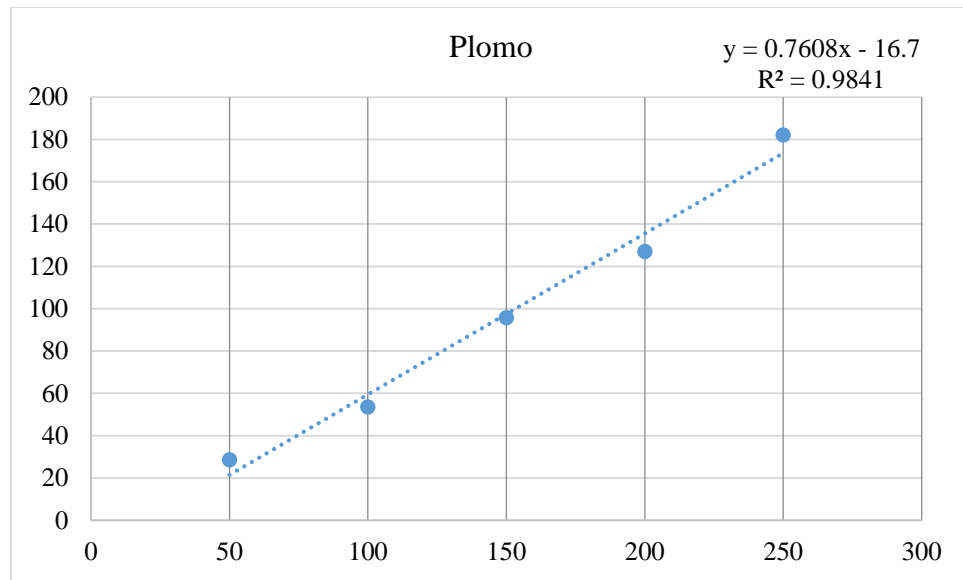
Xie, Z., Qiu, J. y Chen, X. (2013). Decline of nest site availability and nest density of underground bees along a distance gradient from human settlements. *Entomological Science*, 16(2): 170-178.

Zaric, N.M, Ilijevic, K., Stanisavljevic, L. y Grzetic, I. (2016). Metal concentrations around thermal power plants, rural and urban areas using honeybees (*Apis mellifera* L.) as bioindicators. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13: 413-422.

Zhou, X., Taylor, M. P., Davies, P. J. y Prasad, S. (2018). Identifying sources of environmental contamination in European honey bees (*Apis mellifera*) using trace elements and lead isotopic compositions. *Environmental science and technology*. 52(3):991-1001.

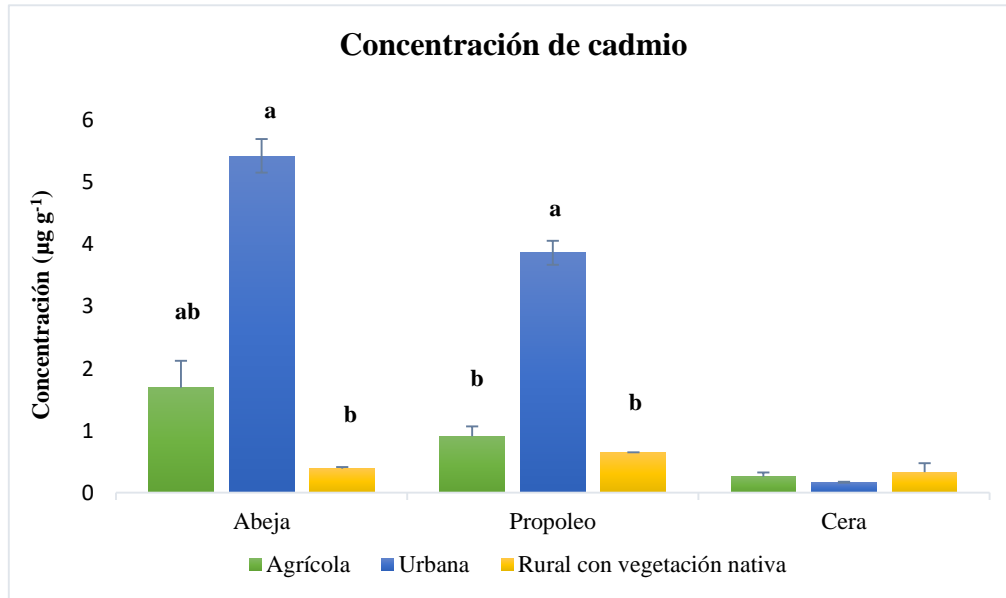
ANEXO 1 CURVAS DE CALIBRACIÓN



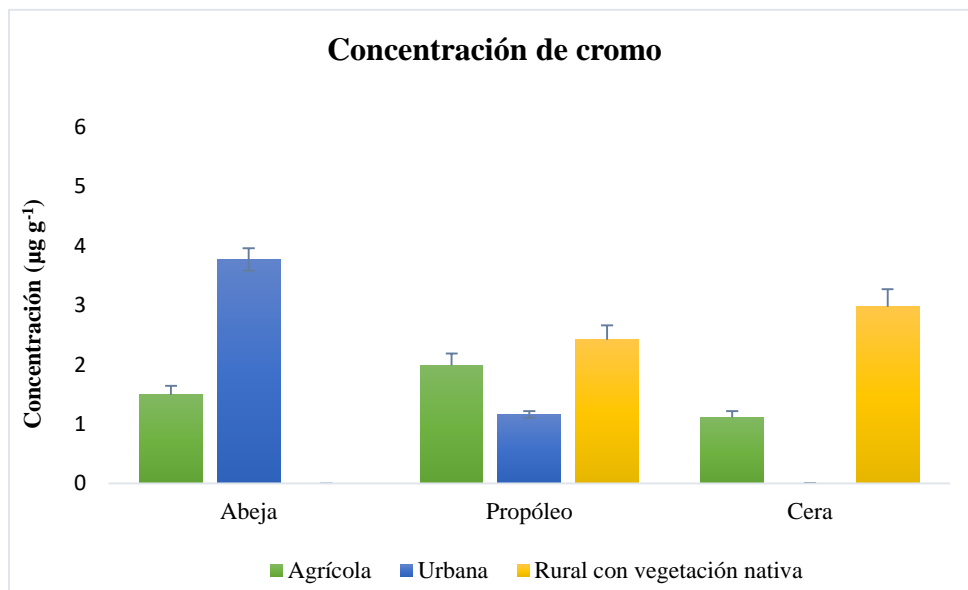


ANEXO 2

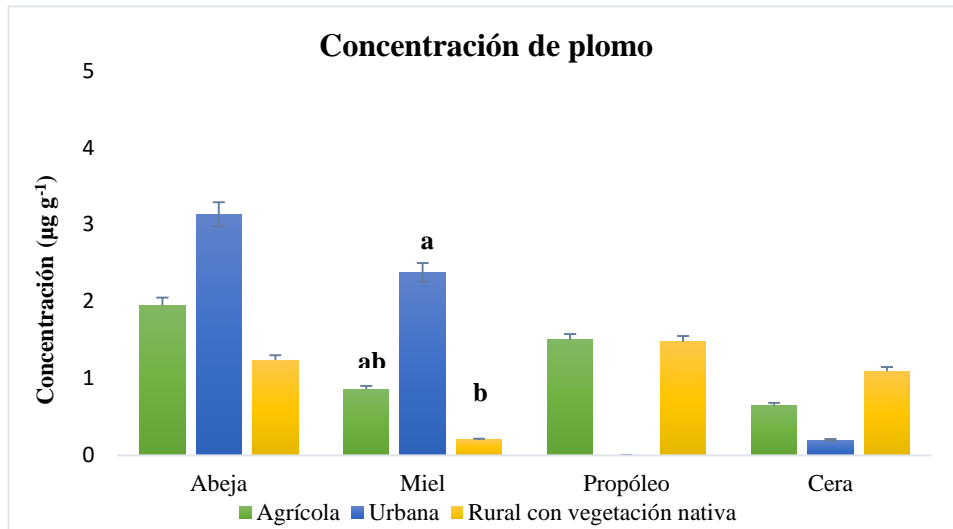
CONCENTRACIONES DE METALES EN LOS SITIOS CON DIFERENTE USO DE SUELO (CAPÍTULO 1)



Concentraciones de cadmio ($\mu\text{g g}^{-1}$). Letras diferentes representan diferencias significativas entre las zonas estudiadas.



Concentraciones de cromo ($\mu\text{g g}^{-1}$).



Concentraciones de plomo presentes abeja, miel, propóleo y cera de las diferentes zonas estudiadas. Muestras de miel <LD. Letras diferentes representan diferencias significativas entre las zonas estudiadas.

ANEXO 3

REGULACIÓN

Actualmente la Legislación para la presencia de contaminantes en miel en México no contempla la regulación de metales pesados, ya que, a pesar de existir una Norma Federal Mexicana (NMX-F-036-1997, ALIMENTOS-MIEL- ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA), así como un proyecto de NOM (PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-004-SAG/GAN-2017, Producción de miel y especificaciones que expone las características que debe presentar la miel), no se considera la presencia de dichos contaminantes. Es importante contar con un indicador que permita conocer los límites permisibles de metales pesados en productos de abeja, es por esto que los resultados obtenidos en el presente trabajo se comparan con los límites establecidos en las siguientes Normas Internacionales. La Norma Internacional contempla miel, sin embargo, para el caso de Normas que no especifican éste producto, se consideran límites permisibles en productos similares como zumo, néctar y jarabe natural de fruta, fructosa o en algunos países, límites en cualquier alimento.

País	Producto	Cd
Brasil	Zumos y jarabes naturales	0.5
Polonia	Miel	0.1
Suiza	Zumo, néctar y jarabe de fruta	0.03
País	Producto	Cr
Brasil	Cualquier alimento	0.1
País	Producto	Pb
Unión Europea	Zumo, néctar y jarabe de fruta	0.05
Brasil	Fructosa	0.5
<i>Codex Alimentarius</i>	Zumo, néctar y jarabe de fruta	0.05
Sudáfrica	Zumo, néctar y jarabe de fruta	0.3
Suiza	Zumo, néctar y jarabe de fruta	0.2
Polonia	Miel	0.4
Estados Unidos	Miel	0.3

Legislación Internacional para límites permisibles de metales pesados en miel. Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$).

ANEXO 4

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

Avances del presente trabajo fue presentado en los siguientes congresos:

- XXI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Oaxaca, Oax. México, 15 al 17 de junio de 2016
- LI Congreso Nacional de Entomología, Santiago de Querétaro, México, 19 al 22 de junio de 2016
- Primer lugar en presentación de cartel, LI Congreso Nacional de Entomología, Santiago de Querétaro, México, 19 al 22 de junio de 2016
- II Congreso Nacional de Fauna Nativa en Ambientes Antropizados, Santiago de Querétaro, México, 12 al 14 de octubre de 2016
- XXII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Chetumal, Q. Roo., México, 7 al 9 de junio de 2017
- Simposio: Ecología Urbana, VI Congreso Mexicano de Ecología, agosto de 2017